



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Tecnología Médica

**Frecuencia del gen *aac(6')-Ib-cr* en *Escherichia coli*
uropatógenas productoras de Betalactamasas de
Espectro Extendido (BLEE) en el Hospital Nacional
Docente Madre Niño San Bartolomé, Lima-2018**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Luis Eduardo VELÁSQUEZ REYES

ASESOR

Carlos Raúl SEVILLA ANDRADE

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

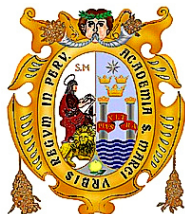
Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Velásquez L. Frecuencia del gen *aac(6')-Ib-cr* en *Escherichia coli* uropatógenas productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé, Lima-2018 [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2020.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	0000-0002-3951-5613 https://orcid.org/0000-0002-3951-5613
Autor DNI	Luis Eduardo Velásquez Reyes 47275683
Código ORCID del asesor	0000-0001-9938-9922 https://orcid.org/0000-0001-9938-9922
Asesor DNI	Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade 16009552
Grupo de investigación	Resistencia a los antimicrobianos “MICRESIS”
Agencia financiadora	País de la agencia financiadora: Perú
	Nombre y siglas de la agencia financiadora: Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (VRIP)-UNMSM
	Nombre del programa financiero: Programa de promoción de tesis de pregrado 2018
	Número de contrato: A18010554
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación (incluirse localidades y/o coordenadas geográficas).	Lugar: Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Av. Universitaria /Calle Germán Amezaga 375. Lima-Perú Coordenadas geográficas: Latitud: 12° 03’ 30” S; Longitud: 77° 05’ 00” W
Año o rango de años que la investigación abarcó.	2018 - 2020
Disciplinas OCDE	Enfermedades infecciosas http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.08 Tecnología médica de laboratorio http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.06.02 Bioquímica, Biología molecular http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica

"AÑO DE LA UNIVERSALIZACIÓN DE LA SALUD"



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Conforme a lo estipulado en el Art. 113 inciso C del Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (R.R. No. 03013-R-16) y Art. 45.2 de la Ley Universitaria 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Dirección de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

Presidente: Dr. Heli Jaime Barrón Pastor
Miembros: Lic. Boris Moisés Valdivia Vizarraga
Mg. Martín Gaspar Magallanes Sebastián
Asesor : Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 27 de agosto del 2020, siendo las 11:30 horas, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado **"Frecuencia del gen *aac(6')*-Ib-cr en *Escherichia coli* uropatógenas productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé, Lima-2018"**, para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica del Señor:

LUIS EDUARDO VELÁSQUEZ REYES

Habiendo obtenido el calificativo de:

.....19.....
(En números)

.....DIECINUEVE...
(En letras)

Que corresponde a la mención de: **.SOBRESALIENTE.**

Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

.....
Presidente

Dr. Heli Jaime Barrón Pastor
D.N.I: 09793154

.....
Miembro

Lic. Boris Moisés Valdivia Vizarraga
D.N.I: 25557178

.....
Miembro

Mg. Martín Gaspar Magallanes Sebastián
D.N.I: 21811014

.....
Asesor de Tesis

Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade
D.N.I: 16009552

Datos de plataforma virtual institucional del acto de sustentación: Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:

https: <https://medical-int.zoom.us/j/92668638282>

ID:

Grabación archivada en:



Firmado digitalmente por CORNEJO VALDIVIA DE ESPEJO Angela Rocío
FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 07.09.2020 11:08:08 -05:00

Frecuencia del gen *aac(6')-Ib-cr* en *Escherichia coli* uropatógenas
productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en
el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé,
Lima-2018

Autor: Bachiller, Velásquez Reyes, Luis Eduardo

Asesor: Lic.TM Sevilla Andrade, Carlos Raúl
Profesor Asociado - Tiempo Completo 40 horas

Coasesor: Lic.TM Soto Pastrana, Javier Orlando

Dedicatoria

A mis padres Eladio y Marina; mis hermanos, Yaqui, Ruth y Rudy.

A mis sobrinas, Alexandra, Angela, Hanna y a mi ahijado, Mijael.

A mi enamorada, Elizabeth.

A MIS MAESTROS de mi Alma mater por su gran apoyo y motivación para la culminación de mi carrera profesional, por enseñarme a ser cada día mejor profesional.

“Algún día diré no fue fácil, pero lo logré”

Agradecimiento

A Dios, por haberme guiado por el buen camino, por haberme dado salud y por haberme brindado una hermosa familia y buenas amistades.

A mis padres, por brindarme su comprensión, cariño y apoyo en todo momento. A mis hermanos, primos y cuñados por sus palabras de aliento y buenos deseos para el desarrollo de mi tesis.

Al Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade, por aceptar ser mi asesor, por ayudarme en cada proceso de la investigación, por su paciencia y por motivarme a ser un buen profesional.

Al Lic. Javier Soto Pastrana por ayudarme en la ejecución de mi proyecto de tesis, así como aceptar ser mi coasesor. Infinitas gracias.

A los compañeros del laboratorio de microbiología del HONADOMANI San Bartolomé por ayudarme al acceso de la información y a la recolección de las muestras.

A la Dra. Hilda Solís Acosta (Directora del DAMM) y a la Dra. Vilma Béjar Castillo (Directora del IMT-DAC), por las facilidades para el desarrollo de mi tesis en los laboratorios del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión.

Al Dr. Jorge Alarcón Villaverde y a la MSc Milagros Zavaleta Apestegui, por posibilitar el desarrollo de mi tesis en el LEMYG – CITBM.

A los investigadores del LEMYG-CITBM, Laura, Rocío, Sandra, Alejandro y Brayan, por apoyarme y orientarme en el proceso de optimización de los protocolos de PCR.

A la Lic. Esther Valencia por el apoyo brindado durante la ejecución de mi tesis.

A mi estimada amiga, Cyntia Mayta Fernández, por su apoyo incondicional desde el inicio y en todo el desarrollo de mi tesis.

A mi amigo, Wilder Gonzales Tume, por su amistad incondicional y apoyo en todo el desarrollo de mi tesis.

Asimismo, un especial agradecimiento, al personal técnico del DAMM, Sra. Albina Arangues Tenemas, Srta. Ana Arangues Tenemas y al Sr. Gregory Marca Bocanegra, por la confianza y el apoyo brindado durante el desarrollo de mi tesis.

Al personal técnico del área de bacteriología del IMT, Sra. Gladys Atausupa y Sra. Noemi Ramos, por su apoyo brindado durante la estandarización de mis procedimientos.

A mis amigos de trabajo, Noemi, Victor, Germán, Jhina, Clara, Nelsa y Jefferson, por sus palabras de aliento y su apoyo para la culminación de mi tesis.

Al Lic. Daniel Javier por los permisos de trabajo brindados para poder culminar mi tesis.

A la Srta. Renatta Rebeca Rafaella Ortiz Huiza, egresada de Lingüística de la Facultad de Letras de la UNMSM, por la revisión lingüística de esta tesis.

A todas las personas y amigos en general que contribuyeron con un granito de arena para culminar con éxito esta investigación.

Al Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales – CITBM, agradecerles por el respaldo brindado por el laboratorio y a través de sus investigadores.

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, un especial agradecimiento por la financiación a través del concurso de tesis de pregrado. Código del Proyecto A18010554 (2018).

Asimismo, al Grupo de investigación MICRESIS-resistencia a los antimicrobianos del VRIP-UNMSM, agradecerles por el respaldo brindado.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES.....	2
1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	7
1.3 OBJETIVOS.....	9
1.3.1 Objetivos generales	9
1.3.2 Objetivos específicos	9
1.4 BASE TEÓRICA.....	10
1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS.....	35
1.4.4 HIPÓTESIS	38
CAPÍTULO II	39
MÉTODOS	39
2.1 DISEÑO METODOLÓGICO	40
2.1.1 Tipo de investigación	40
2.1.2 Diseño de la investigación.....	40
2.1.3 Población	40
2.1.4 Muestra y muestreo	40
2.1.5 Criterios inclusión.....	40
2.1.6 Criterios de exclusión.....	41
2.1.7 Variables.....	42
2.1.8 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	43
2.1.9 Procedimientos y análisis estadístico.	44
2.1.10 Consideraciones éticas	52
CAPÍTULO III.....	53

RESULTADOS.....	53
CAPÍTULO IV.....	71
DISCUSIÓN	71
CAPÍTULO V	77
CONCLUSIONESY RECOMENDACIONES	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXOS	89

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación de antibióticos aminoglucósidos	16
Tabla 2. Clasificación de los antibióticos quinolonas	19
Tabla 3. Clasificación de antibióticos β -lactámicos.....	23
Tabla 4. Características de los oligonucleótidos (<i>primer</i>) usados para el PCR.....	47
Tabla 5. Máster Mix de la PCR del gen <i>aac(6')-Ib</i>	48
Tabla 6. Mezcla de la Digestión – BtsCI para la detección del alelo <i>aac(6')-Ib-cr</i>	50
Tabla 7. Distribución de los aislados según sexo y procedencia	54
Tabla 8. Presencia del gen <i>aac(6')-Ib-cr</i> según el sexo y procedencia	55
Tabla 9. Susceptibilidad antibiótica por el método de Kirby-Bauer de las <i>E. coli</i> BLEE (n= 91)	58
Tabla 10. Frecuencia de la enzima <i>aac(6')-Ib-cr</i> en relación con las susceptibilidades a ciprofloxacina y norfloxacina mediante el método de Kirby-Bauer. (n= 91).....	64
Tabla 11. Concordancia entre el fenotipo <i>aac(6')-Ib-cr</i> vs PCR-RFLP <i>aac(6')-Ib-cr</i>	65
Tabla 12. Medidas simétricas (κ = kappa).....	65

Lista de gráficos

Gráfico 1. Distribución de las edades de los pacientes según el sexo.....	55
Gráfico 2. Distribución de susceptibilidades, según el reporte del Hospital mediante el MIC del equipo VITEK.....	67
Gráfico 3. Diferencia de halos entre ciprofloxacina y levofloxacina.	100

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Los antimicrobianos de la familia de β -lactámicos y quinolonas se han considerado, por mucho tiempo, el tratamiento eficaz de primera línea contra las infecciones urinarias, sin embargo, la aparición de mecanismos de resistencia ha conllevado a fallas en la terapia antibiótica. La presencia de patrones de resistencia como las mutaciones en las topoisomerasas y los genes plasmídicos expresados en fenotipos resistentes, requiere especial consideración en el reporte del antibiograma, ya que ocasiona una reducción de fármacos útiles para el tratamiento. Estos genes junto a la presencia de enzimas tipo BLEE, se han logrado convertir en un problema de salud pública debido a la alta resistencia generada. El polimorfismo genético producido en el gen *aac(6')-Ib* desarrolla la presencia del gen *aac(6')-Ib-cr*, un alelo que se presenta coexistiendo con otros genes de resistencia y se pueden transferir por medio de los elementos genéticos móviles. La detección del alelo consigue facilitar el hallazgo y sospecha de mutaciones cromosómicas, especialmente las mutaciones en las topoisomerasas. **OBJETIVO:** Determinar la frecuencia del gen *aac(6')-Ib-cr* en *Escherichia coli* uropatógenas productoras de BLEE en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé desde enero a setiembre del 2018. **METODOLOGÍA:** Estudio de enfoque cuantitativo, con diseño descriptivo de corte transversal. Se recolectaron 100 aislados de *E. coli* productoras de BLEE provenientes de los urocultivos, de los cuales 91 cumplieron los criterios del estudio. Se confirmó la producción de enzimas tipo BLEE por el método de Jarlier, también se evaluó la susceptibilidad a quinolonas (CLSI, 2018). Asimismo, se empleó como *screening* un test fenotípico para la enzima *aac(6')-Ib-cr*; previo al proceso molecular. Finalmente, la determinación de los genes *aac(6')-Ib* y *aac(6')-Ib-cr* fue mediante PCR convencional y PCR-RFLP, respectivamente. **RESULTADOS:** La PCR del gen *aac(6')-Ib* resultó en 53% (48/91), seguidamente fue evaluada por PCR-RFLP, y se obtuvo que el 100% (48/48) presentó el alelo *aac(6')-Ib-cr*. De 91 aislados, el 88% fueron resistentes tanto a ciprofloxacina como a norfloxacina. **CONCLUSIÓN:** El 53% de los aislados de *E. coli* BLEE portaban el alelo *aac(6')-Ib-cr*; no se encontró el gen *aac(6')-Ib*.

Palabras clave: Infecciones urinarias, *E.coli*, resistencia betalactámica, quinolonas, genes, plásmidos, alelos, PCR, RFLP, (Fuente: DeCS-BIREME).

ABSTRACT

INTRODUCTION: The antimicrobials of the β -lactam and quinolone family have long been considered the effective first-line treatment against urinary tract infections, however, the emergence of resistance mechanisms has led to failures in antibiotic therapy. The presence of resistance patterns such as mutations in topoisomerases and plasmid genes expressed in resistant phenotypes requires special consideration in the antibiogram report, since it causes a reduction in useful drugs for treatment. These genes, together with the presence of ESBL-type enzymes, have become a public health problem due to the high resistance generated. The genetic polymorphism produced in the *aac(6')-Ib* gene develops the presence of the *aac(6')-Ib-cr* gene, an allele that occurs coexisting with other resistance genes and can be transferred through genetic elements mobiles. Allele detection makes it easier to find chromosomal mutations, especially mutations in topoisomerases. **OBJECTIVE:** To determine the frequency of the *aac(6')-Ib-cr* gene in uropathogenic *Escherichia coli* producing ESBL at the National Teaching Hospital Madre Niño San Bartolomé between January and September 2018. **METODOLOGY:** The Quantitative approach study, with descriptive design of cross-section. Of 100 isolates of ESBL-producing *E. coli* were collected from urine cultures, of which 91 isolates met the study criteria. The production of ESBL-type enzymes was confirmed by the Jarlier method, the susceptibility to quinolones was also evaluated (CLSI, 2018). Likewise, a phenotypic test for the enzyme *aac(6')-Ib-cr* was used as screening; prior to the molecular process. Finally, the *aac(6')-Ib* and *aac(6')-Ib-cr* genes were determined by means of conventional PCR and PCR-RFLP respectively. **RESULTS:** The PCR of the *aac(6')-Ib* gene resulted in 53% (48/91), then it was evaluated by PCR-RFLP, and it was obtained that 100% (48/48) presented the allele *aac(6')-Ib-cr*. Of 91 isolates, 88% were resistant to both ciprofloxacin and norfloxacin. **CONCLUSION:** The 53% of the *E. coli* ESBL isolates carried the allele *aac(6')-Ib-cr*; the *aac(6')-Ib* gene was not found.

Keywords: Urinary tract infections, *E.coli*, beta-Lactam resistance, quinolones, genes, plasmids, alleles, PCR, RFLP, (Source: DeCS-BIREME).

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

El estudio de los patrones de resistencia hacia las quinolonas constituye una herramienta útil para guiar el tratamiento empírico de una infección bacteriana del tracto urinario (ITU) ⁽¹⁾. La aparición de nuevos mecanismos de resistencia, sumada a la rápida transferencia de genes entre bacterias, resalta el rol importante que tienen las estructuras genéticas móviles (plásmidos, transposones, integrones, etc.) en el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos ⁽²⁾. Los genes de origen plasmídico *PMQR* (por la sigla en inglés de *Plasmid Mediated Quinolone Resistance*) y los genes de origen cromosómico *QRDR* (por la sigla en inglés de *Quinolone Resistance Determining Region*) se encargan de regular la resistencia a las quinolonas ⁽³⁾, incluso se han descrito que estos, coexisten con otros genes del tipo BLEE; involucrándose de esta manera los mecanismos de resistencia en la aparición de gérmenes multirresistentes ⁽⁴⁾. Según la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas *IDSA* (por la sigla en inglés de *Infectious Diseases Society of America*), los β -lactámicos y quinolonas se consideran antibióticos de primera línea en el tratamiento de la ITU por *E. coli*, sin embargo, según publicaciones nacionales se han reportado frecuencias elevadas de resistencia en ambos ⁽⁵⁾, ⁽⁶⁾. Por lo que este estudio se enfocará en la presencia del alelo *aac(6')-Ib-cr* como marcador plasmídico de resistencia a quinolonas ⁽⁷⁾, asimismo se evaluará la susceptibilidad frente a algunos antibióticos de las cuatro generaciones de quinolonas. A continuación, se describirán los estudios relacionados con la investigación realizada en diferentes periodos de tiempo y distintos países.

En un Hospital de Francia, Fihman et al. ⁽⁸⁾ recolectaron aislados de enterobacterias en 2 periodos: en el periodo 1, entre 1999-2001, recolectaron 102 aislamientos con fenotipo BLEE de un total de 12 129 enterobacterias. Mientras que en el periodo 2, durante el 2005, recolectaron 10 aislamientos con fenotipo BLEE de un total de 704 enterobacterias. En ambos periodos identificaron la especie bacteriana y realizaron la confirmación de BLEE mediante el protocolo del CLSI. Tipificaron los aislamientos por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE), obteniéndose en el periodo 1, un total de 66 aislados no clonales distribuidos en 9 especies, de los cuales 18 portaban integrones, encontrándose a su vez las enzimas BLEE tipo TEM en 8 aislamientos; las de tipo SHV en 6; la de tipo CTX-M-2 en 1; 3 fueron indeterminados. De las 66 enterobacterias productoras de BLEE, treinta (45%) portaban el gen *aac(6')-Ib*. En el periodo 2, se tipificaron 9 aislados no clonales de las 10 productoras de BLEE. Solo 18 (27%) y 6 (66%) de los periodos 1 y 2, respectivamente, portaban el integrón clase 1. El gen *aac(6')-Ib* fue encontrado en 5 (50%) de las 10 enterobacterias BLEE recolectadas en el periodo 2. La *aac(6')-Ib-cr* solo fue detectada en 3 *E. coli* aisladas en el periodo 2 durante el 2005, estando siempre asociadas con el gen *CTX-M-15*. Asimismo, el MIC para fluoroquinolonas de las 3 *E. coli* resultaron ser resistentes a norfloxacin y ciprofloxacina. Los autores concluyeron que el alelo *aac(6')-Ib-cr* fue hallada en *E. coli* ~30% (3/10) de las enterobacterias BLEE positivas, y está emergiendo en cepas de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en Francia especialmente en portadores del gen *bla_{CTX-M-15}*.

En el estudio realizado entre 1998 y 2002, en 6 provincias de China, Jiang et al. ⁽⁹⁾ recolectaron un total de 362 aislados entre ellos: 99 aislados de *K. pneumoniae* y 263 aislados de *E. coli* productoras de BLEE. Realizaron el *screening* para BLEE según el manual del CLSI, determinaron la MIC mediante E-test y analizaron los genotipos por PCR. Unos 62 de 362 aislados fueron positivos para *aac(6')-Ib*, de los cuales 36 aislamientos presentaron el gen *aac(6')-Ib-cr*. De acuerdo con lo anterior, 21 de 43 *E. coli aac(6')-Ib* positivas y 15 de las 19 *K. pneumoniae aac(6')-Ib* positivas, portaban la variante. Los autores investigaron el genotipo BLEE y encontraron una mayor frecuencia del genotipo CTX-M-9, que fue detectado en el 90% de los aislamientos productores de BLEE y, en menor medida, en los tipos TEM y SHV. Además, este estudio describe la coexistencia del gen *qnr* con los genes *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* y *bla_{SHV}*.

Jiang y colaboradores concluyeron que estos últimos genes se lograron ubicar en un mismo plásmido junto al alelo *aac(6')-Ib-cr*, siendo el 8% (21/262) en los aislamientos de *E. coli* BLEE, lo que evidencia una transmisión de diferentes mecanismos de resistencia, que produce un perfil de multiresistencia y de fácil diseminación.

En el 2006, en Estados Unidos, Park et al. ⁽¹⁰⁾ realizaron un estudio en el que describieron un total de 313 enterobacterias: 106 *K. pneumoniae*, 160 *Enterobacter* spp. y 47 *E. coli*. Se seleccionaron aquellas con un perfil de MIC ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ hacia ceftazidima y MIC $\geq 0,25$ $\mu\text{g/mL}$ a ciprofloxacina. Los investigadores describieron que eran susceptibles a ciprofloxacina (MIC ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$) 31 aislamientos de *K. pneumoniae*, 54 de *Enterobacter* spp. y ninguna de las 47 *E. coli*. La presencia del gen *aac(6')-Ib* fue del 50,5% (158 de 313) en los aislamientos, y utilizando la enzima BstF5I para detectar el alelo *aac(6')-Ib-cr*, resultó en 28% (44 de 158); encontrándose distribuidos en 15 (32%) de 47 *E. coli*, 17 (16%) de 106 *K. pneumoniae*, y 12 (7,5%) de 160 *Enterobacter* spp. de los recolectados en el periodo de estudio. Además, detallaron que no existía alguna relación de los genes *qnr* (A, B o S) con la presencia del alelo *aac(6')-Ib-cr* ya que estos circulaban de manera independiente. Los autores concluyeron que la frecuencia del alelo *aac(6')-Ib-cr* resultó en 32% de las *E. coli* productoras de BLEE siendo, también, resistentes o intermedias a ciprofloxacina.

En el 2007, en Túnez, Jouini et al. ⁽¹¹⁾ recopilaron 18 aislados de *E. coli* productoras de BLEE, de las cuales 8 provinieron de hemocultivos; y 10, de urocultivos. En 17 de los aislados, se presentó el gen *bla*_{CTX-M-15} asociándose con *bla*_{OXA-1}, y 4 de estas con el gen *bla*_{TEM-1b}. Las susceptibilidades se hallaron por el método de disco difusión en Mueller-Hinton (M-H). Es importante resaltar que 1 de los 17 aislados positivos al *bla*_{CTX-M-15} presentó, además, un fenotipo de resistencia a gentamicina o tobramicina, identificándose los genes *aac(3)-II* y *aac(6')-Ib*. El gen *aac(6')-Ib-cr* estuvo asociado con una susceptibilidad reducida a aminoglucósidos y fluoroquinolonas y fue identificado en 9 de los 10 aislados (90%) portadores del gen *bla*_{CTX-M-15} provenientes de urocultivos. Cabe resaltar que las 18 *E. coli* no presentaron los genes *qnrA*, *qnrS* ni el gen *qnrB*. Jouini y cols. concluyeron que la presencia de los genes *bla*_{CTX-M-15} con

*bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1}, *aac*(6')-*Ib-cr* y el *aac*(3)-*II* en la misma cepa es alarmante, ya que este tipo de bacterias muestra un perfil de multiresistencia .

En el 2008, Yang et al. ⁽¹²⁾ efectuaron un trabajo en China a partir de 421 enterobacterias y contaron 265 aislados con MIC \geq 0,25 μ g/mL hacia ciprofloxacina. Realizaron un *screening* y dividieron los aislados en 2 grupos: el grupo 1 (197 aislados) tenía un MIC \geq 2 μ g/mL hacia cefotaxima y MIC \geq 2 μ g/mL a ceftriaxona; mientras que el grupo 2 (68 aislados), un MIC $<$ 2 μ g/mL hacia cefotaxima o ceftriaxona. Detectaron el alelo *aac*(6')-*Ib-cr* en 36 (18,3%) de los 197 aislamientos del grupo 1, encontrándose en el 16,9% de las *E. coli* aisladas; sin embargo, no hubo diferencia significativa con respecto al segundo grupo (18,3% en el grupo 1 vs. 16,9% en el grupo 2; *p* >0,05). Evaluaron las enzimas *bla* y llegaron a la conclusión que existe una relación entre la producción del *bla*_{CTX-M} y la resistencia a ácido nalidíxico o fluoroquinolonas que puede ser explicada por la alta incidencia del gen *qnr* en bacterias tipo BLEE, y que el gen *aac*(6')-*Ib-cr*, frecuentemente, se suma a esta cotransmisión y coselección por medio de elementos genéticos móviles.

En el 2011, en un Hospital Universitario Italiano de Padua, Frasson et al. ⁽¹³⁾ recolectaron un total de 197 enterobacterias, de las cuales 104 fueron susceptibles (MIC \leq 1 μ g/ml); 35 fueron intermedios (1 μ g/mL < MIC < 4 μ g/mL); y 58 fueron resistentes (MIC \geq 4 μ g/mL) hacia ciprofloxacina. Se halló el MIC mediante el E-test. Los aislamientos fueron 145 *E. coli*, 38 *K. pneumoniae*, 5 *P. mirabilis*, 5 *E. aerogenes*, 2 *E. cloacae* y 2 *C. freundii*. El gen *aac*(6')-*Ib* se encontró en 25 de los 197 aislados, y 16 de estos fueron positivos para el alelo *aac*(6')-*Ib-cr* (encontrada sólo en *E. coli*), mientras que el gen *aac*(6')-*Ib* tuvo predominio en *K. pneumoniae*. De los 16 aislados positivos al gen *aac*(6')-*Ib-cr*, 15 provenían de urocultivos y eran resistentes al ácido nalidíxico y fluoroquinolonas; también confirmaron el fenotipo BLEE, que tenía genes plasmídicos *bla*_{CTX-M-1} (no se encontraron genes *AmpC*). Los autores concluyeron que los 16 aislamientos positivos al gen *aac*(6')-*Ib-cr* también portaban el genotipo *bla*_{CTX-M-1} (en mayor porcentaje); siendo identificado el gen *aac*(6')-*Ib-cr* en 16 *E.coli* de las 58 enterobacterias resistentes a ciprofloxacina (27,5 %).

En el 2012, en Chile, Elgorriaga et al. ⁽¹⁴⁾ realizaron una investigación para determinar la frecuencia del alelo *aac(6')-Ib-cr* en enterobacterias de cepas hospitalarias, conformadas por *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de BLEE. Los autores incluyeron 100 cepas de *E. coli* y 100 cepas de *K. pneumoniae* con resistencia al ácido nalidíxico además con susceptibilidad intermedia o resistente a ciprofloxacina. Los resultados mostraron que el alelo *aac(6')-Ib-cr* tuvo una prevalencia del 54% en cepas de *K. pneumoniae* y 74% en cepas de *E. coli*.

En Bolivia, Saba et al. ⁽¹⁵⁾ realizaron un estudio con el objetivo de caracterizar los determinantes de resistencia a los antibióticos β -lactámicos y quinolonas mediados por plásmidos, para ello recolectaron 101 enterobacterias productoras de BLEE. Dicho estudio se realizó en los centros de salud de Cochabamba, desde diciembre de 2012 a marzo de 2013, donde reportaron que las BLEE detectadas fueron en su totalidad de tipo CTX-M, de las cuales 89 correspondieron a CTX-M1; 10, a CTX-M9; 1, a CTX-M2; y 1 aislamiento tuvo la presencia simultánea de CTX-M1 y CTX-M9; además, un 71% de los aislamientos portaban al gen *bla_{oxa-1}*. Hubo una alta frecuencia de mecanismos que confieren resistencia a ambas familias de antibióticos (quinolonas y β -lactámicos), teniendo el 93% de resistencia a las quinolonas con la identificación de los genes plasmídicos (PMQR). El gen *aac(6')-Ib* fue detectada en 87 aislamientos, siendo 84 de estos confirmados mediante RFLP usando la enzima de restricción BseGI. Finalmente, hallaron el alelo *aac(6')-Ib-cr* en el 85,7 % (84/98) del grupo de aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae*, ambas productoras de BLEE y con prevalencia en la *E. coli*.

En el 2015, en Argentina, Rincón et al. ⁽¹⁶⁾ trabajaron con 3 grupos de muestras provenientes de Perú, Colombia y también de Argentina. En particular, de los 27 aislados de enterobacterias provenientes de Perú, se aislaron 14 *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación (RCTG), a los cuales se les realizaron la detección genotípica de *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD*, *qepA* y *aac(6')-Ib-cr* mediante el PCR. Se determinó el alelo *aac(6')-Ib-cr* mediante la digestión con la enzima BseGI y se confirmaron por secuenciación. Adicionalmente, se les encontró a todos los aislamientos mutaciones en los genes *GyrA* y *ParC*. En cuanto a los resultados, se

obtuvo que el 55,5% (15/27) de enterobacterias portaban el alelo *aac(6')-Ib-cr* y 3 de ellos presentaron también genes del tipo *qnrB*. En todos los aislados de Perú, se detectaron las enzimas tipo BLEE, siendo la CTX-M-1 la de mayor frecuencia, seguido de CTX-M-9 y, finalmente, CTX-M-2.

En el 2017 en Irán, Goudarzi et al. ⁽¹⁷⁾ recolectaron un total de 290 (71,7%) aislamientos de *E. coli* de 410 pacientes hospitalizados con diagnóstico de ITU, de los cuales el 51,7% (150/290) fue BLEE positivo al método de confirmación de Jarlier. Las susceptibilidades de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE mostraron *in vitro* que todos los aislamientos eran resistentes a amoxicilina y penicilina, siendo además resistentes a otros antibióticos (15 antimicrobianos). Entre los 150 aislados BLEE positivos, se encontraron las siguientes frecuencias: *aac(6')-Ib* (74,7%), *oqx A* (8%), *oqx B* (4%), *qnr A* (3,3%), *qnr B* (1,3%), *qnr S* (2%) y *qep A* (2,7%). La existencia conjunta de *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} y *aac(6')-Ib* fueron los genotipos de resistencia mayormente encontrados.

En nuestro país, existen pocos estudios enfocados en el estudio del gen *aac(6')-Ib* y su alelo *aac(6')-Ib-cr*, asimismo, no hay referencias nacionales sobre un método para la detección fenotípica de la enzima inactivante en *E. coli* uropatógenas productoras de BLEE; es por ello que, contándose con el expedito para el acceso y disponibilidad de aislados clínicos en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé, se realizó esta investigación para lograr un mayor interés y proponer nuevos métodos en el aislamientos de gérmenes uropatógenos con resistencia plasmídica a quinolonas.

1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Justificación teórica-científica

El estudio brindará información actual sobre la frecuencia del gen *aac(6')-Ib-cr* en los aislados de *E. coli* y, a partir de esta investigación, se podrá estimar la frecuencia del gen en aislados de *E. coli* en los diversos laboratorios de microbiología, a nivel nacional. Asimismo, los resultados permitirán aproximar la frecuencia de otros genes plasmídicos en otros aislados uropatógenos, ya que estos se encuentran conformando

cassetes genéticos, logrando de esta forma, transferirse diversos tipos de genes mediante elementos genéticos móviles; describiendo una variación de frecuencias a lo largo del tiempo.

Este estudio vincula la presencia de genes plasmídicos de resistencia a quinolonas con la susceptibilidad hacia ciprofloxacina y norfloxacin. Además, el hallazgo de genes plasmídicos involucra la presencia de genes cromosómicos; confieren ambos un perfil resistente en el reporte del antibiograma. Cabe agregar, que el estudio también ofrece explorar la frecuencia actual de sensibilidad hacia las quinolonas. Y a su vez, abrirá camino en la investigación de las frecuencias en otros genes plasmídicos de resistencia a quinolonas.

Justificación práctica

El estudio ayudará a conocer cómo un polimorfismo genético puede comportarse como promotor de un nuevo mecanismo de resistencia, ya que la variable de estudio es un alelo del gen *aac(6')-Ib*. Asimismo, ayudará a generar protocolos para la elaboración y reporte de antibiogramas con resistencia a quinolonas.

Justificación legal

Para el desarrollo oportuno de esta investigación y manejo seguro de información se consideraron los principios éticos de veracidad, imparcialidad, transparencia, independencia, responsabilidad y respeto; abordados en el código de ética de investigación de la UNMSM.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Determinar la frecuencia del gen *aac(6')-Ib-cr* en *Escherichia coli* uropatógenas productoras de BLEE en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé entre enero-setiembre del 2018.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia del gen *aac(6')-Ib* mediante el PCR.
- Determinar la frecuencia del alelo *aac(6')-Ib-cr* mediante el PCR-RFLP.
- Describir a las *E. coli* con fenotipo BLEE resistentes a ciprofloxacina y norfloxacina siendo además portadores de la enzima y el alelo *aac(6')-Ib-cr*.
- Identificar la susceptibilidad antibiótica a quinolonas resaltando las sensibilidades en ciprofloxacina y norfloxacina.

1.4 BASE TEÓRICA

INFECCIÓN DEL TRACTO URINARIO

La infección del tracto urinario (ITU) se relaciona con la existencia de microorganismos patógenos en el sistema urinario con la presencia o ausencia de síntomas⁽¹⁸⁾. El origen de la ITU es de un 80-90% bacteriano, y la definición exacta exige no solo la presencia de gérmenes en el tracto urinario, sino además su cuantificación de al menos 10^5 unidades formadoras de colonias en 1 mL (UFC/mL) de orina recolectada del chorro medio. En el caso de los hombres, al tener una menor probabilidad de contaminación, se considera como sugerente de infección una cifra de al menos 10^3 (UFC/mL)⁽¹⁹⁾. A continuación, se describirán las definiciones de los tipos de infecciones de las vías urinarias^{(18), (19), (20), (21)}, según su división anatómica:

- **Infección urinaria baja:** Se caracteriza por los siguientes signos y síntomas: disuria, polaquiuria, turbidez y olor fétido de la orina. También incluyen la cistitis y uretritis.
- **Infección urinaria alta:** Los signos y síntomas de la ITU baja pueden o no estar presentes clásicamente (encontrándose en este grupo, la pielonefritis), puede presentarse por cuadros de fiebre, dolor en el ángulo renal, náusea y vómitos.

En función de la existencia de complicaciones:

- **ITU no complicada:** Esta ocurre en pacientes que tienen un tracto urinario normal, sin alteraciones funcionales o anatómicas, sin un historial reciente de instrumentación (sondaje, uretro-cistoscopia o proceso quirúrgico). Este tipo de infección es muy frecuente en mujeres jóvenes sexualmente activas.
- **ITU complicada:** Esta ocurre debido a las alteraciones anatómicas o funcionales, presencia de bacterias multirresistentes, incluyendo el inadecuado manejo farmacológico, que pueden propiciar una infección de recidiva o al fracaso terapéutico. Este tipo de infecciones es a menudo encontrado en los adultos mayores.

Recidiva y reinfección ⁽¹⁹⁾

- **Recidiva:** Infección recurrente por el mismo microorganismo en un tiempo menor a seis semanas.
- **Reinfección:** Infección recurrente por un microorganismo diferente o el mismo en un tiempo mayor a seis semanas.

ITU nosocomial: Se refiere a la aparición de ITU a partir de las 48 horas de hospitalización de un paciente sin evidencia de infección, asociada a algún procedimiento invasivo, dando énfasis a la colocación de un catéter urinario.

Bacteriuria asintomática: Esta se refiere a la presencia de bacteriurias significativas ($\geq 10^5$ UFC/mL) sin presentar síntomas en ambos géneros; además, en portadores de sonda urinaria, una muestra con más de 100 UFC/mL es considerada significativa.

EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ITU

Del grupo de infecciones que afectan a la población, las que ocurren en el tracto urinario (ITU) representan una de las urgencias médicas más frecuentes, y son adquiridas tanto a nivel hospitalario como en la comunidad. Presenta una tasa de infección de al menos un caso de ITU durante la vida adulta, en el 40% de mujeres y el 12% de hombres, aproximadamente ⁽⁶⁾. En Estados Unidos, aproximadamente, el 10% de mujeres ha tenido uno o más episodios de ITU sintomático por año. En el Perú, se desconocen cifras exactas de su incidencia, pero es muy probable que estas sean similares a las de EE. UU. La prevalencia de ITU en hombres es significativamente menor que en las mujeres; este orden se invierte con el pasar de los años, ya que el hombre en la vejez empieza a tener cambios anatómicos que lo predispone a las ITU. En el caso de las gestantes, cabe resaltar que también sufren cambios anatómicos y estructurales durante su gestación, predisponiéndola de adquirir ITU ⁽²⁰⁾. La población posterior al nacimiento (lactantes y niños) también es susceptible de ITU, ya que presenta una prevalencia aproximada del 2% al 5%. Niños menores a los 2 años, con fiebre, sin una focalización definida, presentan una ITU entre el 5% y 8%. A partir de los 3 años, la ITU es mucho más frecuente en niñas escolares llegando a padecer cerca del 5% ⁽²¹⁾.

ETIOLOGÍA

El agente etiológico predominante en ambos sexos es la *Escherichia coli*, siendo responsable en el 75% a 80% de casos; el restante 20% a 25% engloba otros microorganismos como: *Staphylococcus saprophyticus*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella* spp., *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* ⁽²²⁾.

Escherichia coli

Es definido como un bacilo gramnegativo de la familia *Enterobacteriaceae*; conforma parte de la microbiota; presenta movilidad; posee flagelos peritricos; tiene metabolismo no exigente; es un anaerobio facultativo; metaboliza la glucosa por oxidación y fermentación; además, es catalasa (+), oxidasa (-), reductor de nitrato a nitrito, entre otros ⁽²³⁾.

Escherichia coli uropatógena

La *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) proviene filogenéticamente de las *E. coli* del tracto digestivo y causa las infecciones del tracto urinario (ITU). Las *E. coli* extraintestinales, inicialmente, mantienen una buena relación simbiótica con el hospedero formando parte de la microbiota; sin embargo, cuando el hospedero se encuentra inmunocomprometido, las *E. coli* extraintestinales pueden tener la capacidad de colonizar el tracto urinario mediante la expresión y producción de diferentes factores de virulencia. Estos últimos les brindan mecanismos para reproducirse en lugares donde normalmente no colonizan, de esta forma, logran evadir al sistema inmune del hospedero; finalmente, se convierten en el agente uropatógeno, siendo la *E. coli* UPEC el agente etiológico más frecuente de ITU ^{(23), (24)}.

Los factores de virulencia pueden estar presentes en algunas bacterias grampositivas, pero es más predominante en bacterias gramnegativas. También están presentes en las bacterias patógenas y raramente en bacterias no patógenas de la misma especie bacteriana; estas secuencias pueden ser transferidas horizontalmente de especie a especie. Los factores de virulencia son los siguientes ^{(24), (25)}:

- Adhesinas
- Toxinas
- Sideróforos
- Cápsula
- Lipopolisacárido
- Motilidad
- Mecanismo de escape inmunológico

I. DEFINICIÓN, ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE AMINOGLUCÓSIDOS, QUINOLONAS Y β -LACTÁMICOS

I.1 AMINOGLUCÓSIDOS

Los aminoglucósidos son un grupo de antibióticos de amplio espectro que se componen de aminoazúcares y conforman un alcohol cíclico hexagonal con radicales amino (denominados “aminociclitol”). Por lo tanto, la correcta denominación es “aminoglucósidos aminociclitoles”; sin embargo, en la práctica habitual se emplea el primer nombre (figura 1) ⁽²⁶⁾.

Actúan a través de la inhibición de la síntesis de proteínas. Estos han sido importantes en la terapia antibacteriana desde la aparición de la estreptomina, la cual fue aislada del *Streptomyces griseus* e introducida en el uso clínico en 1944. Posteriormente, fueron apareciendo otros como la neomicina (1949, *S. fradiae*), luego la kanamicina (1957, *S. kanamyceticus*), gentamicina (1963, *Micromonospora purpurea*), netilmicina (1967, derivado de sisomicina), tobramicina (1967, *S. tenebrarius*), y amikacina (1972, derivado de la kanamicina). Desde 1980, se logra modificar el uso de la terapia antibiótica, dejando de lado a los aminoglucósidos, siendo reemplazados por las cefalosporinas de 3° generación, carbapenémicos y fluoroquinolonas, los cuales manifestaban una menor toxicidad. Sin embargo, el incremento de la resistencia a los antibióticos ha conllevado a producir modificaciones en la estructura de los aminoglucósidos apareciendo nuevos y mejorados antibióticos como la arbekacina y plazomicina. Teniendo un mejor espectro de acción contra las bacterias multirresistentes ^{(26), (27)}.

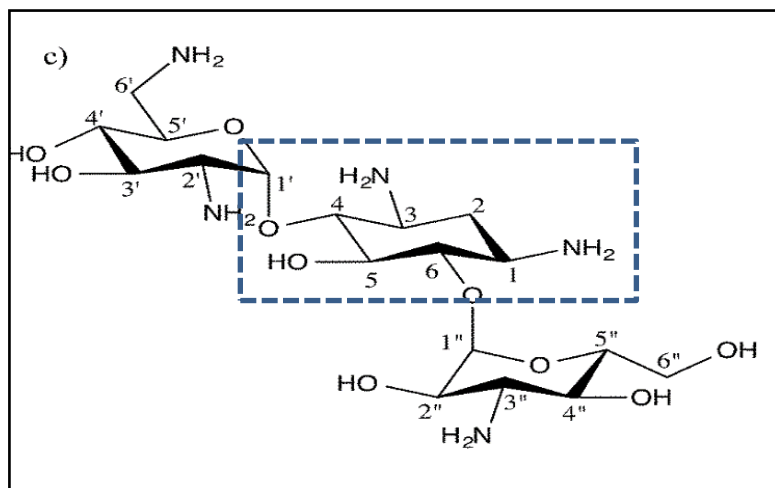


Figura 1. Estructura química de la kanamicina y su anillo aminociclitol.

Fuente: Bacot-Davis, V. et al. 2016; J. Med. Chem. Comm.

Se clasifican en dos grupos según posean el componente aminociclitol: estreptidina o desoxiestreptamina (tabla 1). El primero solo se refiere a la estreptomicina. El segundo grupo incluye los antimicrobianos más empleados en la práctica médica (kanamicina, gentamicina, neomicina y paromomicina). De manera peculiar, la espectinomicina es el compuesto que se conforma únicamente por aminociclitol ⁽²⁷⁾.

Tabla 1. Clasificación de antibióticos aminoglucósidos

Aminoglucósidos con aminociclitol	
Aminociclitol estreptidina	
Estreptomicina	
Aminociclitol desoxiestreptamina	
Disustituidos 4,6	
Familia Kanamicina	
Kanamicina	
Amikacina	
Tobramicina	
Dibekacina	
Familia Gentamicina	
Gentamicina	
Sisomicina	
Netilmicina	
Isepamicina	
Disustituidos 4,5	
Neomicina	
Paromomicina	
Aminociclitol sin aminoglucósidos	
Espectinomicina	

Fuente: Palomino, J. et al. 2003; Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. Pág.106 ⁽²⁷⁾.

I.2. QUINOLONAS

Los antibióticos quinolonas constituyen el grupo de antimicrobianos de mayor desarrollo y de gran empleabilidad en la terapia farmacológica. Su estructura está formada por 2 anillos y está compuesta por un nitrógeno (posición 1), un carboxilo (posición 3) y un grupo carbonilo (posición 4). La presencia del átomo de flúor aumenta significativamente la potencia y el espectro farmacológico cuando este se ubica en la posición 6. En el caso del grupo piperacínico (presente en ciprofloxacina y norfloxacina), este logra aumentar la potencia frente a bacterias gramnegativas cuando se ubica en la posición 7 ^{(15), (28)}.

El ácido nalidíxico fue la primera quinolona descubierta, la cual tuvo una utilidad clínica desde 1962; fue descrito como un compuesto eficaz contra algunos aerobios gramnegativos, principalmente, en infecciones urinarias. Sin embargo, la relación entre la estructura química y la actividad biológica de esta molécula ha permitido el desarrollo de nuevos fármacos, lo que ha modificado de manera importante su actividad antimicrobiana brindando una baja toxicidad y un amplio espectro de actividad. Desde 1978, un nuevo agente farmacológico, denominado fluoroquinolona, se sintetizó a partir del ácido nalidíxico, conteniendo un átomo de flúor y confiriendo una mayor actividad frente a bacterias grampositivos y gram negativos ⁽²⁸⁾.

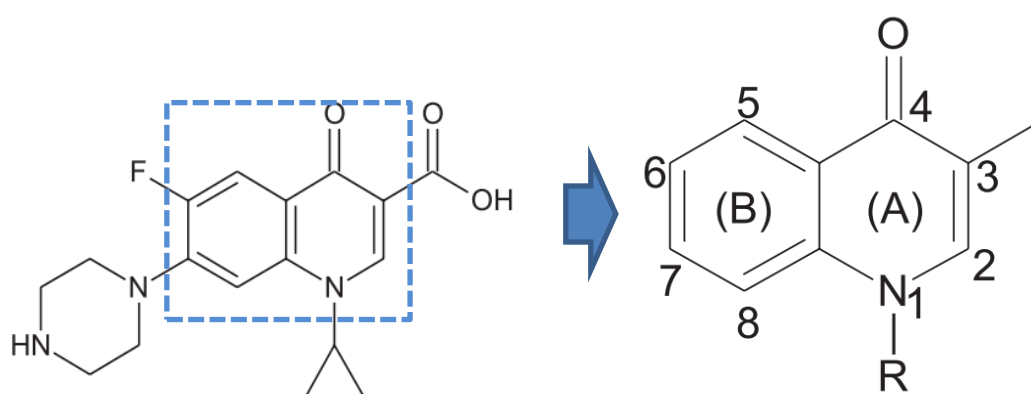


Figura 2. Estructura química de la ciprofloxacina.

Se detallan las posiciones de los anillos A y B, como parte del anillo base.

Fuente: Prabodh, S. et al. 2009; Rev. Acta Poloniae Pharmaceutica. pág589.

Por muchos años, las fluoroquinolonas se consideraron la última generación de quinolonas, sin embargo, las transformaciones de su estructura química generaron ventajas en el desarrollo de nuevos compuestos, han sido empleadas para el tratamiento de infecciones intra y extrahospitalarias, de esta manera, las fluoroquinolonas se han convertido en una herramienta clínica importante debido a la gran biodisponibilidad y formas de administración, que pueden ser por las vías enteral y parenteral. Sin embargo, el uso desmesurado de quinolonas (en medicina, industria del consumo humano, agricultura, etc.) ha desencadenado un aumento de la resistencia bacteriana para esta familia de antibióticos, constituyéndose actualmente en cuatro generaciones ^{(3), (29)}.

En la tabla 2, se clasifican a las quinolonas en cuatro generaciones. En la primera generación son denominadas “quinolonas propiamente dichas”, abarcan al ácido nalidíxico, ácido pipemídico, cinoxacina, etc. Además de poseer limitada actividad frente a enterobacterias gramnegativas, resultan prácticamente inactivas frente a bacterias grampositivos. En la segunda generación, las quinolonas se denominan fluoroquinolonas y están conformadas por norfloxacin, ciprofloxacina, lomefloxacina, etc. Poseen gran actividad frente a gramnegativos, incluyendo a los no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa*. En el grupo de la tercera generación se incluyen a la levofloxacina, grepafloxacina y esparfloxacina; conservan las propiedades de las segundas presentando, además, una mayor absorción por vía oral y gran actividad frente a *P. aeruginosa* y grampositivos. Por último, las de cuarta generación abarcan a gatifloxacina, gemifloxacina, moxifloxacino; presentan una reducida actividad frente a *P. aeruginosa*, sin embargo, aportan una mejor actividad frente a grampositivos ^{(2), (30)}.

Tabla 2. Clasificación de los antibióticos quinolonas según sus generaciones

Generación	Antibióticos	Espectro de actividad (*)
1º(*)	- Ácido nalidíxico.	Principalmente enterobacterias.
	- Ácido oxolínico.	Bacilos gramnegativos: <i>E.coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp. y <i>Shigella</i> spp.
	- Cinoxacina.	
2º	- Ciprofloxacina.	Incluyendo las de 1º generación. Espectro extendido en gramnegativos, inicia cobertura contra cocos grampositivos y “atípicos”.
	- Fleroxacina.	
	- Lomefloxacina.	Bacilos gramnegativos: <i>P. aeruginosa</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>S. maltophilia</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>Campylobacter</i> spp.
	- Norfloxacina.	
	- Ofloxacina.	
	- Pefloxacina.	Cocos grampositivos: <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> . Patógenos atípicos: <i>C. trachomatis</i> , <i>Mycoplasma</i> spp.
3º	- Levofloxacina.	Incluyendo las de 2º generación. Bacilos gramnegativos, espectro extendido en cocos grampositivos y “atípicos”.
	- Esparfloxacina.	Bacilos gramnegativos: Mismos que en 1º y 2º generación.
	- Grepafloxacina.	Cocos grampositivos: <i>S. pneumoniae</i> y <i>S. pyogenes</i> . Patógenos atípicos: <i>C. pneumoniae</i> y <i>M. pneumoniae</i> .
4º	- Gatifloxacina.	Incluyendo las de 3º generación. Bacilos grampositivos, espectro extendido en anaerobios y “atípicos”.
	- Gemifloxacina.	Cocos grampositivos: <i>S. pneumoniae</i> y <i>S. aureus</i> (resistente a penicilina)
	- Moxifloxacina.	
	- Rovafloxacina.	Anerobios: <i>Bacteroides</i> spp., <i>Clostridium</i> spp.
	- Trovafloxacina.	Patógenos atípicos: <i>L. pneumophila</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>Ureaplasma</i> spp.

(*) *Excepción en gérmenes multirresistentes.*

Fuente: Álvarez. D et al. 2015; Revista Chilena de Infectología. Pág. 500⁽³⁾.

En cuanto al modo de empleo, se administran en forma oral o intravenosa. La biodisponibilidad es la misma en cualquiera de las formas de tratamiento (70-90%), aunque la vía oral puede alterarse por la ingesta de alimentos, antiácidos que contengan magnesio, aluminio, calcio o sucralfato, así como, la presencia de multivitamínicos de hierro o zinc. La vida media es de aproximadamente 1,5 a 16 h en adultos y posee una distribución promedio de 1,5 L/kg, los valores más altos son alcanzados por las quinolonas de cuarta generación. Se metabolizan a través del hígado, por medio del

citocromo p450, también pueden ser metabolizadas por otros mecanismos secundarios. La excreción únicamente se da por la vía hepática o renal, las quinolonas hidrofílicas como ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina se eliminan por el riñón; mientras que las quinolonas hidrofóbicas como levofloxacina, esparfloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina, por medio del hígado ⁽³⁾.

I.3 β -LACTÁMICOS

Estos antibióticos poseen un anillo β -lactámico que estructuralmente conforma parte de cuatro subfamilias de antibióticos; el anillo heterocíclico presenta tres átomos de carbono y uno de nitrógeno; la actividad antimicrobiana va relacionada según las cadenas laterales presentes en los radicales libre, ver figura 3 ⁽²³⁾.

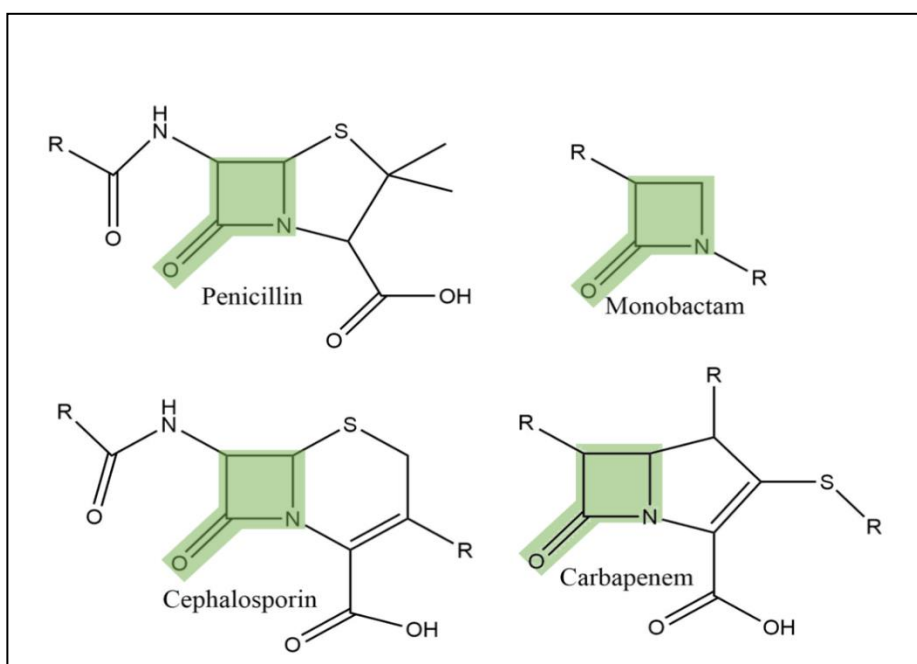


Figura 3. Estructura química del anillo β -lactámico de las 4 sub-familias: penicilinas, monobactámicos cefalosporinas y carbapenémicos.

Fuente: DiLallo, H. 2018; Saint Mary's College, Notre Dame, IN.

Los β -lactámicos fueron obtenidos en 1920 del *Penicillium notatum* y descubiertos en 1928 como agentes bactericidas frente a un gran espectro de bacterias. Es así, que los β -lactámicos se convirtieron en el agente antimicrobiano más utilizado durante y posterior a la segunda guerra mundial, convirtiéndose en el antibiótico más famoso de la historia ⁽³¹⁾.

Este grupo representa a la familia más numerosa de antimicrobianos, siendo la más usada en la terapia antibiótica. Se trata de antibióticos con una lenta acción bactericida que brinda una buena tolerancia; además, poseen buena distribución y baja toxicidad. Pese a su amplia prescripción, existe un grupo de esta familia (penicilinas, amoxicilina y cefalosporinas) con tendencia a producir una respuesta alérgica en ciertas personas sensibilizadas, generando cuadros de anafilaxis ^{(32), (33)}.

La aparición de nuevos compuestos con mayor espectro antimicrobiano, derivados de las modificaciones en la molécula original, ha llevado a la aparición progresiva de resistencia limitando de esta forma al uso empírico y eficacia en determinadas situaciones. No obstante, la penicilina continúa siendo de elección para el tratamiento de un buen número de infecciones; por otra parte, los carbapenémicos tienen una aplicación en infecciones nosocomiales y en infecciones por bacterias multirresistentes ^{(33), (34)}.

En la siguiente tabla, se presenta la clasificación de los β -lactámicos:

Tabla 3. Clasificación de antibióticos β -lactámicos

Antibióticos	Clases
Penicilinas	- Penicilina, amoxicilina, ticarcilina y piperazilina.
Cefalosporinas	<ul style="list-style-type: none"> - 1º generación: Cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefradina. - 2º generación: Cefaclor, cefuroxima. - 3º generación: Cefpodoxima, cefoperazona, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima. - 4º generación: Cefepime. - 5º generación: Cefdinir, cefixime. - 6º generación: Ceftolozane (<i>Antipseudomonas</i>).
Monobactámicos	- Aztreonam.
Carbapenémicos	- Imipenem, meropenem y ertapenem.

Fuente: Bush, K. et al 2016; Cold. Spring. Harb. Perspect. Med ⁽³³⁾.

II. MECANISMOS DE ACCIÓN DE AMINOGLUCÓSIDOS, QUINOLONAS Y β -LACTÁMICOS

II.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DE AMINOGLUCÓSIDOS

La acción de los aminoglucósidos consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas mediante la unión de alta afinidad en el sitio A del 16S RNA ribosomal de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. El resultado de esta interacción produce que los aminoácidos no se ensamblen correctamente en los polipéptidos, lo que posteriormente, ocasiona daño a nivel de la membrana celular. Algunos aminoglucósidos pueden impactar también en la síntesis de proteínas mediante el bloqueo de la elongación o directamente inhibiendo a la iniciación. El mecanismo exacto de unión y el subsecuente efecto inhibitorio varía según la estructura química, pero todos los aminoglucósidos tienen una rápida acción bactericida ⁽²⁶⁾.

II.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE QUINOLONAS

Las quinolonas actúan inhibiendo la síntesis del ADN bacteriano a nivel del ADN girasa y la topoisomerasa IV resultando en muerte bacteriana por autólisis. Como regla general, la actividad de las quinolonas en las bacterias gramnegativas se correlacionan con la inhibición del ADN girasa, y su actividad en grampositivos se corresponde con la inhibición de la topoisomerasa tipo IV. Las quinolonas ingresan a la célula mediante un sistema de difusión pasiva, principalmente, atravesando la membrana por medio de las porinas. Las topoisomerasas intervienen en el proceso de síntesis del ADN, y participan en los desenrollamientos y enrollamientos del ADN cromosómico bacteriano ^{(35), (36)}.

El ADN girasa tiene 2 subunidades A y 2 subunidades B. El ADN girasa es la única enzima responsable del superenrollamiento negativo en la cadena de ADN, consiguiendo la separación de la doble hélice de ADN para mantener la estructura de la horquilla de replicación, mientras que la topoisomerasa IV es responsable de la separación en dos moléculas “hijas” al finalizar la replicación, obteniendo la segregación en dos nuevas células “hijas”. Los genes que codifican para estas enzimas son *gyrA* y *gyrB* (para la subunidad A y B, respectivamente) del ADN girasa y los genes *parC* y *parE* (para la subunidad A y B, respectivamente) de la topoisomerasa IV^{(35), (37)}.

II.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE β -LACTÁMICOS

Los β -lactámicos actúan en la etapa final de la síntesis del peptidoglicano. Intervienen como sustrato competitivo de las transpeptidasas denominadas proteínas fijadoras de penicilina (PBP), ya que presentan una similitud estructural con el extremo D-alanina-D-alanina del pentapéptido que enlaza las cadenas de N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina de la molécula de peptidoglicano. Con ello logran la inhibición de la transpeptidación, se desestabiliza la pared celular y, finalmente, ocurre la lisis bacteriana mediada por autolisinas⁽³⁴⁾.

III. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS: AMINOGLUCÓSIDOS, QUINOLONAS Y β -LACTÁMICOS

III.1. MECANISMO DE RESISTENCIA EN AMINOGLUCÓSIDOS

La resistencia a los aminoglucósidos se da por tres mecanismos: alteraciones de la permeabilidad, las alteraciones en el sitio blanco, y la inactivación enzimática del antibiótico por medio de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA)⁽³⁸⁾.

- a) **Alteraciones de la permeabilidad:** Es un mecanismo de resistencia común entre las bacterias, refiriéndose a la alteración de la membrana bacteriana al ingreso del antibiótico o a la expulsión activa del antibiótico por medio de las llamadas bombas de eflujo⁽³⁵⁾.

- b) **Alteración en el sitio blanco:** Ocurre por mutación cromosómica o mediante una enzima. Las mutaciones cromosómicas son mutaciones puntuales en la expresión de las subunidades del ribosoma que impide la unión, y es el mecanismo más conocido. El otro mecanismo (enzimático) ocurre mediante la metilación ribosomal en la subunidad 16S rRNA y se debe, en parte, a la presencia de los siguientes genes: *armA*, *rmtA* y *rmtB*. Confiriendo resistencia de alto nivel a kanamicina, amikacina, tobramicina, gentamicina y netilmicina, pero no afecta a neomicina ⁽¹⁸⁾.
- c) **Enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA):** Las EMA están localizadas en los plásmidos y contienen múltiples elementos de resistencia, incluyendo a las betalactamasas. La transmisión de estos genes se da por medio de transferencia horizontal; se han reportado más de 100 EMA y se han categorizado en 3 grupos en base a la capacidad de acetilar, fosforilar o adenilar los grupos amino o hidroxilos presentes en los aminoglucósidos. Estas modificaciones logran disminuir la afinidad de la droga por el sitio blanco, ocasionando la pérdida de la acción bactericida. Estas 3 familias de EMA incluyen ^{(18), (26)}:
- **O-fosfotransferasa (APH):** Actúan junto a las kinasas catalizando la transferencia de un grupo fosfato del ATP al grupo hidroxilo del aminoglucósido, ver figura 5.
 - **O-nucleotidiltransferasa (ANT):** Catalizan la transferencia de un nucleótido monofosfato (AMP) de una molécula de ATP a un grupo hidroxilo del aminoglucósido, ver figura 5.
 - **N-acetiltransferasa (AAC):** Catalizan la transferencia de un acetilo desde la acetil-coenzima A hasta un grupo amino del aminoglucósido, ver figura 5.

Cada uno de estos grupos “aac, ant y aph” siguen una nomenclatura para describir el sitio y posición de inactivaciones del antibiótico. De acuerdo al sitio de modificación en el aminoglucósido, se representan mediante números arábigos entre paréntesis; en el caso de los diferentes perfiles de resistencia que genera, se describen con números romanos; y finalmente, si el perfil de resistencia es el mismo, pero poseen alguna variación genética, se agrega una letra minúscula después del número romano ^{(15), (38)}.

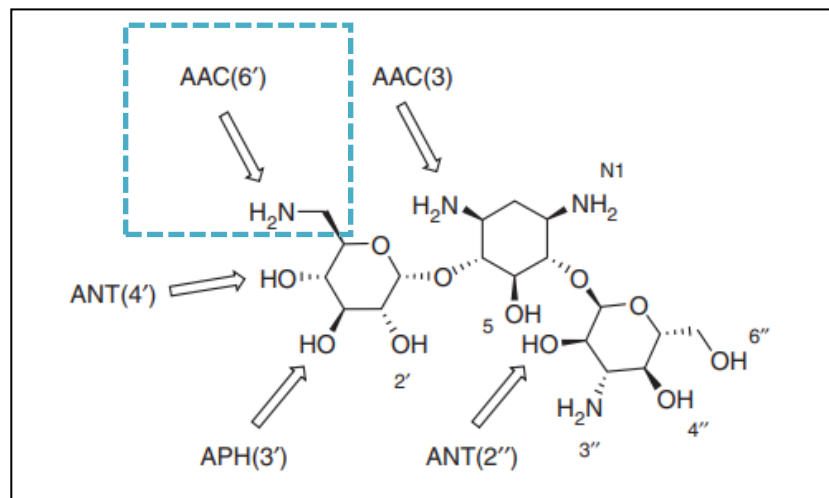


Figura 4. Sitios de modificación química de las EMA sobre la kanamicina A. Se resalta en un cuadro el sitio de unión de la AAC(6').

Fuente: Krause, K. et al 2016; Cold Spring Harb Perspect Med. Pag5 ⁽²⁶⁾.

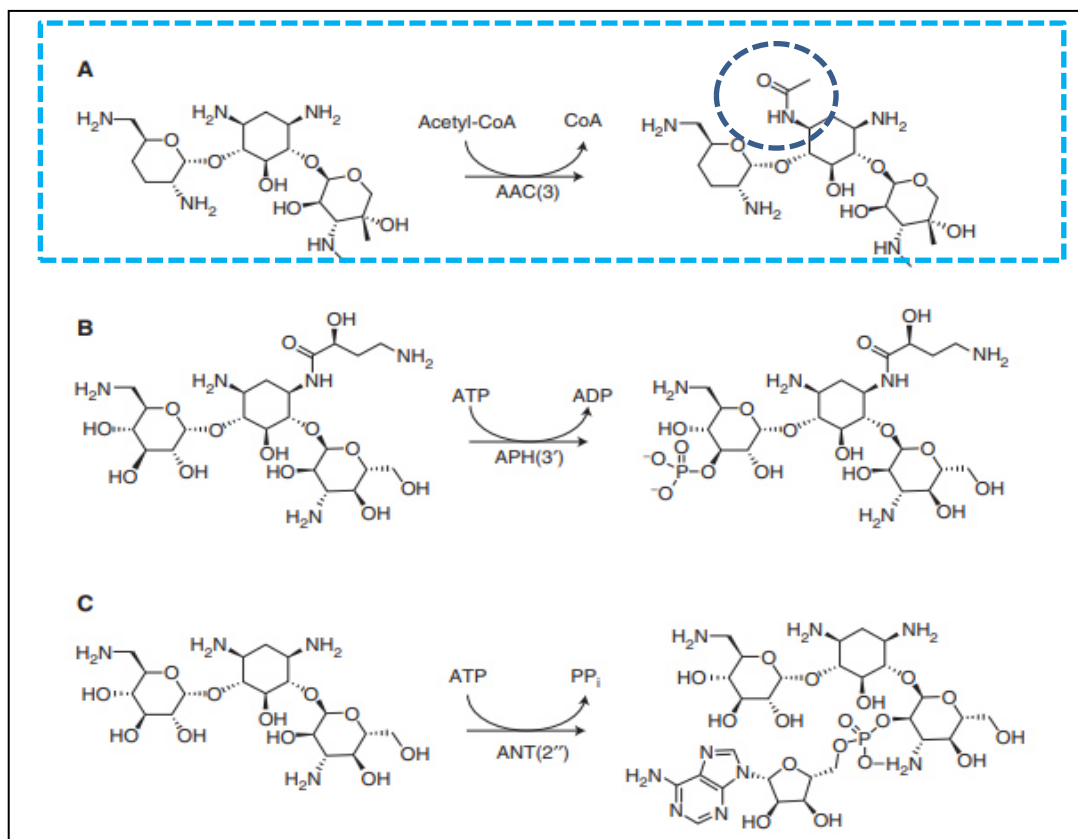


Figura 5. Reacciones y lugar de modificación de las EMAs. Modificación de la AAC(3) sobre la gentamicina. B. Modificación de la APH(3') sobre la amikacina. C. Modificación de la ANT(2'') sobre la kanamicina.

Fuente: Krause, K. et al 2016; Cold Spring Harb Perspect Med. Pág.6⁽²⁶⁾.

En el caso de la enzima aminoglucósido acetiltransferasa o aac, comprende un largo grupo de enzimas formando parte de la superfamilia GCN5-N-acetiltransferasas (GNAT), y agrupa un promedio de 10 000 proteínas descritas. Esta enzima tiene la capacidad de acetilar en varias posiciones de los aminoglucósidos, siendo dependientes para dicha reacción del acetil coenzima A. Se han descrito 4 subclases principales: aac(1), aac(3), aac(2') y la aac(6'). Se han observado en bacterias gramnegativas diferentes patrones de resistencia de acuerdo a la presencia de 1 o más “aac” involucrados en el mecanismo de resistencia. Así, se tiene a la enzima aac(6') modificando a la amikacina, netilmicina y tobramicina. Incluso, la enzima aac(3)-IIa se le atribuye como la responsable de la resistencia a gentamicina, tobramicina y

netilmicina. Por otro lado y menos frecuente, se tiene al híbrido enzimático aac(6')-aph(2') como responsable de una alta resistencia en *Enterococcus faecalis* ⁽²⁶⁾.

Por último, se tiene una enzima variante de aac(6')-Ib presente en las bacterias gramnegativas que poseen la capacidad de modificar a las fluoroquinolonas sin alterar significativamente la actividad contra aminoglucósidos. Esta variante fue descrita por Robicsek et al. como aac(6')-Ib-cr ⁽²⁸⁾.

III.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA EN QUINOLONAS

a) Mecanismo de resistencia por QRDR

Las mutaciones presentes en los genes cromosómicos codificantes de las subunidades A de la girasa y, en menor medida, del área de unión en las subunidades B alteran y contribuyen con una disminución en la afinidad del antibiótico y de igual manera, sucede con las subunidades de la topoisomerasa tipo IV. Existen regiones del ADN bacteriano representadas como una secuencia corta que alberga mutaciones puntuales, las cuales se denominan “regiones determinantes de resistencia a quinolonas”. Las QRDR incluyen las mutaciones presentadas en los blancos primarios y secundarios de *gyrA*, *parC*, y *gyrB*, *parE*, respectivamente. La alteración en el blanco primario induce una mutación en el blanco secundario produciendo una alta resistencia; estas mutaciones se dan en la mayoría de microorganismos gramnegativos portando una combinación de *gyrA* y *parC* alterados. De esta forma se tiene que la fluoroquinolona disminuye la afinidad por el ADN girasa; sin embargo, conserva una afinidad por la topoisomerasa tipo IV ^{(7), (39), (40)}.

Actualmente, se describe que luego de la exposición bacteriana hacia las fluoroquinolonas pierden afinidad totalmente por las 2 subunidades (A y B), la cual produce una alta resistencia hacia estos fármacos ⁽⁴¹⁾.

b) **Alteración en la permeabilidad:** Se da principalmente mediante dos mecanismos:

- **Pasivamente:** Disminución en la permeabilidad natural de la membrana externa mediante modificaciones en las porinas, limitando el paso del antibiótico. Esto es regulado por genes de resistencia como *norC*, *nalB*, *nalD*, *nfxB*, *nfxC*, *marA* y *sox* para las alteraciones en las proteínas de la membrana externa *ompF* y *ompC* ⁽²⁸⁾.
- **Activamente:** Se describen como un exceso de salida de fármacos mediados por genes de resistencia que alteran los mecanismos de flujo externo. Se tienen a los genes codificantes *mexA*, *mexB*, *mexC*, *mexD*, *oprK*, *oprM* y *norA* que participan en el sistema de eflujo ⁽⁴²⁾.

c) Mecanismo de resistencia por genes plasmídicos (PMQR)

Entre los mecanismos de resistencia plasmídico y transmisible destacan:

- **Proteínas qnr:** Se clasifican en *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS*; siendo la proteína *qnrA1* la primera en hallarse en el plásmido *pMG252*, de una cepa clínica de *Klebsiella pneumoniae* con resistencia a ciprofloxacina. Estas proteínas pertenecen a la familia de pentapéptidos repetidos, denominados así porque contienen un cassette recurrente de cinco aminoácidos en tándem cumpliendo el papel de envolver al sitio blanco de la quinolona, de esta manera logran impedir la acción del fármaco ⁽³⁹⁾.
- **Sistemas de expulsión qep:** Este mecanismo se compone de los plásmidos, *pHPA* y *pOLA52*, que generan resistencia a quinolonas mediante su expulsión por sistemas membranales, los cuales causan una reducción intracelular del fármaco. El plásmido *pHPA* se agrupa en la superfamilia de transportadores MFS (por su sigla en inglés de Major Facilitator Superfamily). Esta proteína expulsa las quinolonas hidrofílicas (ciprofloxacina y norfloxacina) del citoplasma. Por otra parte, el plásmido *pOLA52* codifica a *OqxA*, una proteína de membrana

interna perteneciente a la familia de transportadores RND, y a OqxB, una proteína del periplasma. Las proteínas OqxAB confieren resistencia a ácido nalidíxico y ciprofloxacina para conferir resistencia a quinolonas, para lo cual requiere de un tercer componente adicional en la membrana externa, la proteína TolC, formando juntos un complejo “tripartita” de expulsión, OqxAB-TolC, similar a algunos sistemas codificados mediante genes cromosómicos ^{(16), (30)}.

Alelo variante *aac(6')-Ib-cr*: En el año 1986 fue descubierta una enzima modificadora de aminoglucósidos, *aac(6')-I*, que se convirtió en la más prevalente enzima, la cual confiere resistencia a tobramicina, netilmicina, kanamicina y amikacina. El alelo del gen *aac(6')-Ib*, denominada alelo *aac(6')-Ib-cr*, fue descubierta en una cepa de *E. coli*, en Shanghai en el 2003, la cual produce una acetilación en el sustituto de piperazinil en algunas fluoroquinolonas (ciprofloxacina y norfloxacina), y logra disminuir su actividad antimicrobiana. La *aac(6')-Ib-cr* es una proteína de origen plasmídico compuesta de 199 aminoácidos producto de un polimorfismo genético del gen *aac(6')-Ib*, debido a 2 cambios en sus aminoácidos. El primer aminoácido se encuentra en el codón 102, sustituyéndose el triptófano (Trp) por la arginina (Arg); mientras que el segundo, en el codón 179, sustituyéndose la tirosina (Tyr) por la asparagina (Asp) ^{(16), (38)}.

El gen *aac(6')-Ib* tiene su origen en las enterobacterias con resistencia a los aminoglucósidos, lo que genera enzimas modificadores de antibióticos; y su estudio es importante porque contribuye a la resistencia bacteriana, lo cual afecta el tratamiento de las ITU. La enzima *aac(6')-Ib* producida por dicho gen cataliza la acetilación y brinda resistencia a tobramicina, neomicina y amikacina. Inicialmente, se encontró el gen *aac(6')-Ib* en aislados uropatógenos de *K. pneumoniae* y, posteriormente, en los aislados de *E. coli*, el cual es, en la actualidad, el mayor portador de este gen. Posteriormente, la aparición de dos modificaciones en la

secuencia del gen *aac(6')-Ib*, hizo posible la expresión de un alelo variante denominado *aac(6')-Ib-cr*, el cual cobra importancia por la bifuncionalidad expresada de la enzima, siendo capaz de acetilar tanto a los aminoglucósidos como a las fluoroquinolonas (ciprofloxacina y norfloxacina). Cabe resaltar que en el estudio de resistencia a quinolonas se tienen dos niveles: uno de **alto nivel**, que corresponde a los genes cromosómicos (QRDR), y el de **bajo nivel**, perteneciente a los genes plasmídicos (PMQR). Ambos niveles están presentes en los aislados uropatógenos, sospechándose su presencia por medio de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Las *E. coli* uropatógenas BLEE incluyen dentro de su genoma (por medio de los transposones, plásmidos, integrones, etc.) a los genes de alto o bajo nivel de resistencia a quinolonas, adquiriendo las *E. coli* BLEE una multiresistencia a través de la transferencia horizontal o vertical, estos las convierten en un problema de salud pública ^{(7), (15), (43)}.

III.3. MECANISMO DE RESISTENCIA EN β -LACTÁMICOS

Los mecanismos presentes contra los β -lactámicos son los siguientes^{(44), (45), (46)}:

- a) **Alteración de la diana:** Los antimicrobianos se unen a lugares específicos en la bacteria. Estos sitios de unión pueden ser alterados impidiendo la afinidad del fármaco y haciendo que haya pérdida de la actividad antimicrobiana. El principal mecanismo utilizado por las bacterias es la modificación del gen que codifica la diana del antibiótico. La diana modificada para los β -lactámicos es el PBP (proteína ligadora de penicilina).
- b) **Alteraciones de la permeabilidad.** Este mecanismo de resistencia es común para las bacterias, las cuales se pueden dividir en dos: alteraciones en las porinas de las membranas bacterianas y el sistema de bombas de eflujo.
- c) **Inactivación enzimática por betalactamasas.** Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan al anillo β -lactámico, logrando inactivarlos. Pueden ser producidas por microorganismos grampositivos y gramnegativos, encontrándose codificadas en dos compartimentos del genoma bacteriano :
 - Cromosómicas: *bla*_{SHV} en *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter* spp.
 - Plasmídicas (BLEE): *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} en *E.coli* y *K. pneumoniae*.
 - **Clasificación de betalactamasas:** En la actualidad, se utilizan 2 clasificaciones: según la estructura molecular propuesta por Ambler (A, B, C y D) y la postulada por Bush según su funcionalidad (1, 2 y 3). Para el presente estudio se resaltaré la clase A de Ambler y el grupo 2 de Bush, en el cual se describen a las enzimas BLEE, siendo descritas los tipos TEM, SHV y CTX. La clasificación de las betalactamasas se resume en el anexo 6^{(47), (48), (49)}.

Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

Las BLEE se definen como enzimas codificadas por plásmidos capaces de hidrolizar las penicilinas, las cefalosporinas, desde la primera hasta la cuarta generación, y los monobactámicos, excepto las cefamicinas (cefoxitina) y los carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem). Se caracterizan por su inhibición con el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. En 1983, se describió en Alemania la primera enzima (SHV-2), aperturando el capítulo de las BLEE. En Francia, un año después, se describió una TEM-3 con fenotipo semejante. En 1989, se detectó un aislado clínico de *E. coli* con una enzima diferente a estas últimas que se denominó CTX-M-1 por su actividad hidrolítica preferente por la cefotaxima. Se considera que las cefotaximasas CTX-M plasmídicas derivan de las penicilinasas cromosómicas naturales de *Kluyvera* spp^{(50), (51), (52)}.

Desde la década de 1980, se han publicado diferentes protocolos con pruebas fenotípicas que exploran las dos características principales de las BLEE: sensibilidad disminuida a cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam e inhibición de la resistencia por ácido clavulánico. En esta investigación se realizó el *screening* para BLEE por el método de Jarlier^{(37), (47)}.

1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Alelo:** Es una de las 2 o más variantes de un gen.
- **Alelo o variante *aac(6')-Ib-cr* :** Es una variante del gen *aac(6')-Ib* que codifica una aminoglucósido acetiltransferasa capaz de inactivar por acetilación a los antibióticos aminoglucósidos y fluoroquinolonas (específicamente ciprofloxacina y norfloxacina).
- **β -lactámicos:** Representan a un grupo de antibióticos que constan de un anillo heterocíclico de cuatro átomos (tres de carbono y uno de nitrógeno) y que actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, dificultando la síntesis del peptidoglicano.
- **Betalactamasas:** Enzimas codificadas por plásmidos que hidrolizan las penicilinas, las cefalosporinas, desde la primera hasta la cuarta generación, y los monobactámicos, excepto a cefamicinas (cefoxitina) y carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem).
- **Biodisponibilidad:** Es el grado o la velocidad con la que un medicamento u otra sustancia se absorbe o está disponible en el lugar de interés del cuerpo.
- **Cassettes genéticos:** Son un grupo diverso de pequeños elementos móviles que existen tanto en su forma libre circular o cerrado por enlaces covalentes, incluyen un único gen capaz de codificar resistencia a los antimicrobianos.
- **Fagos:** También llamados bacteriófagos; son virus que infectan exclusivamente a las bacterias.
- **Farmacocinética:** Que describe los efectos del agente mientras está en el cuerpo.
- **Farmacodinamia:** Que describe cómo el agente se mueve y se excreta del cuerpo.
- **Fluoroquinolonas:** Son agentes antimicrobianos sintéticos derivados de las quinolonas; llevan flúor con un amplio espectro de actividad antibiótica frente a bacterias grampositivas y gramnegativas.

- **Integrones:** Son estructuras genéticas sin la capacidad de transposición, por lo que se encuentran frecuentemente formando parte de los transposones.
- **Multirresistencia:** Según la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas Multidrogoresistencia (MDR) se define como la resistencia para al menos uno de tres o más categorías de antibióticos.
- **Plásmidos:** Son moléculas circulares de ADN, extracromosomales y autorreplicables transferibles.
- **Prueba de disco difusión (DD):** Ensayo de susceptibilidad antibiótico que utiliza discos embebidos de antibiótico en un medio de agar sólido.
- **Quinolonas:** Pertenecen a un grupo de antimicrobianos cuya principal acción es evitar la producción del ADN.
- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Es una reacción enzimática *in vitro* que aumenta muchas veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos.
- **Screening:** Se refiere a pruebas de laboratorio que poseen una alta sensibilidad en detectar un factor o enfermedad en un total de muestras o personas, pero estos valores obtenidos a su vez carecen de especificidad.
- **Secuencias de inserción (IS):** Se consideran los elementos móviles más sencillos que presentan en cada extremo una secuencia repetida invertida, además son secuencias reconocidas por las transposasas.
- **Transposones:** Son conocidos como genes saltarines son fragmentos de ADN móviles, capaces de insertarse en distintos lugares dentro del cromosoma o plásmido.

LISTADO DE ABREVIATURAS

- ***bla*_{CTX-M}**: Betalactamasa tipo CTX-M.
- ***bla*_{SHV}**: Betalactamasa tipo SHV.
- ***bla*_{TEM}**: Betalactamasa tipo TEM.
- **BLEE**: Betalactamasas de espectro extendido.
- **CLSI**: Estándares Internacionales en el Laboratorio Clínico.
- **E-Test**: Prueba de susceptibilidad de E-test.
- **Gen *qep***: Gen “quinolone efflux pump”.
- **Gen *qnr***: Gen “quinolone resistance”.
- **MIC**: Concentración Mínima Inhibitoria.
- **MFS**: Major facilitator superfamily.
- **QRDR**: Regiones determinantes de resistencia a quinolonas.
- **PMQR**: Genes plasmídicos de resistencia a quinolonas.
- **AK**: Amikacina.
- **GEN**: Gentamicina.
- **TOB**: Tobramicina.
- **NET**: Netilmicina.
- **N**: Neomicina.
- **S**: Estreptomicina.
- **KAN**: Kanamicina.

1.4.4 HIPÓTESIS DESCRIPTIVA

La frecuencia del gen *aac(6')-Ib-cr* en *Escherichia coli* uropatógenas productoras de BLEE en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé, de enero a setiembre de 2018, es menor al 74 %.

En Chile, Elgorriaga et al. ⁽¹⁴⁾ publicaron una prevalencia del 74% en cepas de *E. coli* productoras de BLEE en el 2012.

CAPÍTULO II

MÉTODOS

2.1 DISEÑO METODOLÓGICO

2.1.1 Tipo de investigación

- Enfoque cuantitativo.

2.1.2 Diseño de la investigación

- Descriptivo, transversal, observacional y prospectivo.

2.1.3 Población

- Estuvo conformada por los aislamientos de *E. coli* provenientes de urocultivos del laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé sembradas en medios cromogénicos y procesadas por el Equipo VITEK®2 Compact.

2.1.4 Muestra y muestreo

- La muestra estuvo conformada por aislados de *E. coli* recuperados provenientes de urocultivos del laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé, sembradas en medios cromogénicos, identificadas y antibiogramas con resultados “BLEE positivo” del equipo automatizado VITEK®2 Compact, durante el periodo enero a setiembre del año 2018.
- Tipo de muestreo: Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, tomando en cuenta el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión.

2.1.5 Criterios inclusión

- Recolección de los aislados entre enero a setiembre del 2018.
- Aquellos aislados provenientes de urocultivos.
- Aquellos aislados con fenotipo BLEE confirmados.

2.1.6 Criterios de exclusión

- Los aislados que no se desarrollaron en la reactivación en caldo tripticasa (CTS).
- Los aislados que no fueron identificados como *E. coli* con el CHROMagar Orientation Medium.
- Los aislados reactivados BLEE negativos o producto de la contaminación cruzada.

2.1.7 Variables

Las principales variables de estudio son:

Variable 1:

- Presencia del gen plasmídico *aac(6')-Ib-cr*.

Variable 2:

- Susceptibilidad antibiótica por disco difusión y Concentración mínima inhibitoria (MIC) de ciprofloxacina.

Variable 3:

- Susceptibilidad antibiótica por disco difusión y Concentración mínima inhibitoria (MIC) de norfloxacina.

2.1.8 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La técnica que se empleó fue la observación de la base de datos del equipo automatizado VITEK®2 Compact de cada aislado recolectado. Se utilizó una ficha de recolección, en la cual se registraron todos los resultados que se recopilaron durante la investigación.

Instrumento: Ficha de recolección de datos (anexo 1).

Plan de recolección

Los aislados bacterianos fueron proporcionados por el laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé, abarcando un total de 91 aislados de *E. coli* con perfil fenotípico de BLEE procesados por el sistema automatizado VITEK®2 Compact. Se transportaron al laboratorio del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en crioviales con agar tripticasa de soya (TSA) sembrados por puntura y estría e incubados a 37 °C por 16 a 18 horas.

2.1.9 Procedimientos y análisis estadístico.

I. Estudios microbiológicos

Reactivación de los aislados bacterianos

Se reactivaron los aislados sembrándolos en caldo tripticasa de soya (CTS), incubadas por 18 horas a 37 °C, posteriormente, fueron resembrados en agar TSA y en el medio cromogénico CHROMagar Orientation Medium; finalmente, fueron incubadas a 37 °C por 18 horas.

Almacenamiento

Los aislados reactivados se almacenaron en caldo CTS con glicerol al 20% en congelación (- 20 °C) para su conservación y almacenamiento.

Prueba confirmatoria de BLEE- Método de Jarlier

La prueba por disco difusión de confirmación fenotípica de BLEE, basada en la sinergia de los discos de *screening*: amoxicilina-ácido clavulánico (20/10 µg) y las cefalosporinas de espectro extendido o los monobactámicos. El efecto de sinergismo se visualiza como una imagen en forma de “cola de pez”, “efecto de huevo” o “balón de fútbol americano” y se toma como evidencia de positivo para BLEE ⁽⁴⁷⁾.

Antibiograma para detección de BLEE y susceptibilidad a quinolonas

Asimismo, a las cepas reactivadas en agar TSA se les realizó la prueba de susceptibilidad antibiótica a quinolonas: ácido nalidíxico, cinoxacina, ofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina, lomefloxacina, levofloxacina, gemifloxacina, fleroxacina, gatifloxacina, ertapenem y cefoxitina.

Control de Calidad

Control de calidad del agar Mueller-Hinton

El control de calidad se desarrolló mediante la determinación de las concentraciones de timina/timidina (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212), la concentración de cationes (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), y la medición de la profundidad del agar para que esta sea igual en todo el fondo del agar.

Control de calidad Externo

El servicio de microbiología del HONADOMANI San Bartolomé cuenta con el control externo realizado por la empresa “PROASECAL”, ente que desarrolla de manera periódica la identificación microbiológica en género y especie, pruebas de identificación y susceptibilidad antibiótica en el procesamiento manual y automatizado (VITEK®2 Compact).

Detección de la resistencia acompañante

Se tomaron los datos de sensibilidad antibiótica (MIC) de gentamicina, amikacina, tobramicina, ciprofloxacina y norfloxacina del equipo automatizado VITEK®2 Compact.

Asimismo, se registraron los resultados de moxifloxacina, trimetropim, nitofurantoína, ertapenem, meropenem, imipenem y tigeciclina.

Determinación de MIC-norfloxacin y fenotipo de la enzima aac(6')-Ib-cr

Este método está dividido en 2 etapas: la primera etapa comprende el hallazgo del MIC intermedio (8 µg/mL) por microdilución del norfloxacin en caldo Luria Bertani (LB); la segunda etapa, vinculada a la primera, emplea la *E. coli* ATCC 25922 como un indicador de sensibilidad a la norfloxacin acetilada por la enzima aac(6')-Ib-cr^{(53) (54)}.

Determinación del MIC-Norfloxacin

Se determinó el MIC de norfloxacin por el método de microdilución, y a su vez, también la prueba fenotípica para encontrar el efecto de la enzima variante de acetilasa a los 91 aislados de *E. coli* productoras de BLEE.

Se utilizó una placa estéril de 96 pocillos en la que se realizó una dilución sucesiva al medio del antibiótico norfloxacin por fila, incluyendo un control positivo y un control negativo por cada muestra. Los pocillos contenían un volumen final de 50 µL de antibiótico diluido (desde 128 µg/ml), a los que se les alicuotó un volumen de 50 µL de inóculo bacteriano (1:100 del 0,5 McFarland); luego, se homogenizó y, después, se incubó por 18 horas a 37 °C (anexo 3).

Fenotipo de la enzima acetilasa aac(6')-Ib-cr

Este ensayo se utilizó como *screening* para detectar la producción bacteriana de la enzima inactivadora de norfloxacin en caldo LB, y en caldo Muller Hinton para la determinación del MIC. Esto consiste en el uso del sobrenadante del pocillo con caldo LB con un MIC (norfloxacin = 8 µg/ml) de valor intermedio, del cual se pipeteó 10 µL sobre discos en blanco estériles puestos en una placa de M-H, previamente hisopado con una suspensión de *E. coli* ATCC 25923 al 0,5 McFarland. Se incubó por 18 horas a 37 °C y se midió los halos, respectivamente (Anexo 2).

II. Estudios moleculares

Se empleó la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)-Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sigla en inglés de Restriction Fragment Length Polymorphisms), procesado en el laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética (LEMYG-CITBM) de la UNMSM. Este procedimiento consiste en amplificar el gen codificante mediante una PCR convencional, para luego incubar los amplicones con una enzima de restricción (BtsCI), posteriormente, se inactivará la enzima; y finalmente se determinará la presencia o ausencia del gen *aac(6')-Ib-cr* mediante la electroforesis en gel de agarosa⁽⁵⁵⁾.

Extracción de ADN bacteriano

A partir de cultivos de 24 horas, se realizó una suspensión con 4 a 5 colonias en 300 µL de agua PCR. Se homogenizó en el vórtex y luego se llevó a un bloque térmico digital (Thermoblock™-Biorad) para la extracción del ADN bacteriano por calentamiento (100 °C) durante 10 minutos.

Después de la lisis por calor, se llevó al vórtex para luego centrifugar por 4 minutos a 14 000 RPM y refrigerada a 4 °C.

Posteriormente, se alicuotó entre 200 a 250 µL de sobrenadante a otro criovial y se rotuló con su respectivo código. Finalmente, se almacenaron en congelación – 20 °C para mantener su integridad y estabilidad.

*Detección del gen *aac(6')-Ib* mediante el PCR*

Se utilizó como protocolo de trabajo la siguiente secuencia del *primer*.

Tabla 4. Características de los oligonucleótidos (*primer*) usados para el PCR⁽⁵⁶⁾

Gen	Secuencia de Primer (5' → 3')	pb	T° <i>annealing</i>
<i>aac(6')-Ib</i>	F: TTG CGA TGC TCT ATG AGT GCC TA	482	60 °C
	R: CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT		

Fuente: Yun-Tae et al. 2011. BMB reports pág. 265.

Tabla 5. Máster Mix de la PCR del *gen aac(6')-Ib*

Reactivos	[] Inicial	[] Final	Vol. final 1 Rx.
Buffer [X]	10	1,0	2,5 µL
MgCl ₂ [mM]	50	2,5	1,25 µL
dNTPs [mM]	10	0,1	0,3 µL
<i>aac(6')-Ib</i> - F [µM]	10	0,4	1,0 µL
<i>aac(6')-Ib</i> - R [µM]	10	0,4	1,0 µL
<i>Taq</i> DNA polimerasa [U/µL]	5	0,75	0,15 µL
H ₂ O PCR	-	-	17,8 µL
DNA bacteriano	-	-	1,0 µL
			Vol. final: 25 µL

Fuente: Elaboración Propia.

Adición de ADN

El ADN total extraído fue agregado al Máster Mix en una cabina de bioseguridad del Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética (LEMYG) del IMT DAC-CITBM.

Amplificación

La amplificación del ADN blanco se realizó en un termociclador T100TM marca Biorad a temperaturas y tiempos óptimos conseguido durante la estandarización.

El protocolo de amplificación fue el siguiente:

a) Denaturación inicial: 94 °C por 5 minutos.

b) Ciclado:

Fueron 35 ciclos de:

❖ Denaturación: 94 °C por 45 segundos.

❖ *Anneling*: 60 °C por 45 segundos.

❖ Extensión: 72 °C por 45 segundos.

c) Extensión final de 72 °C por 5 minutos.

Electroforesis del producto amplificado

La separación de los productos de PCR se realizó en una cámara de electroforesis horizontal. Se preparó gel de agarosa grado molecular 1,5% (p/v) en buffer TAE 1X, con 5 µL de Red Safe™ (20 000 X) para cada 100 mL de Buffer TAE 1X. Se dispuso a poner el peine para generar los pocillos en los cuales se cargaron los productos de PCR.

En cada pocillo se cargó 7 µL de producto amplificado mezclado con 1 µL de buffer de muestra (*Geneaid*®). En el centro de cada gel se añade el marcador de pares de bases de 100 Kb-*ladder* (Thermo Scientific). Las condiciones de corrida fueron 100 V por 30 minutos en cámara de electroforesis.

Luego de la corrida, el gel fue puesto en un transiluminador UV (Cleaver Scientific Ltd.) para poder visualizar las bandas de las muestras, controles y *ladder*.

Ensayo de digestión de fragmentos amplificados por PCR-RFLP

*Digestión con la enzima BtsCI de los amplicones de *aac(6')-Ib*⁽⁵⁷⁾*

Se empleó la enzima de restricción BtsCI para el ensayo de PCR-RFLP que permite la diferenciación entre los genes codificantes de la enzima *aac(6')-Ib* y de la variante *aac(6')-Ib-cr*. La enzima BtsCI es capaz de cortar el amplicón obtenido por el gen *aac(6')-Ib*, pero no el de su variante, obteniéndose dos fragmentos: uno de 210 pb y otro de 272 pb.

Tabla 6. Mezcla de Digestión – BtsCI para la detección del alelo *aac(6')-Ib-cr*

Reactivos	Vol. final 1 Rx.
Buffer NE 10X	1 µL
Enzima BtsCI	1 µL
H ₂ O PCR	1 µL
Amplicón de <i>aac(6')-Ib</i>	7 µL
Vol. final: 10 µL	

Incubar 15 minutos a 50°C y después inactivar la enzima por 40 minutos a 80°C.

Visualización de los productos de la enzima BtsCI

Se preparó gel de agarosa grado molecular 2,0 % (p/v) en buffer TAE 1X, con 5 µL de Red SafeTM (20 000 X) para cada 100 mL de Buffer TAE 1X.

En cada pocillo se cargó 9,5 µL del producto amplificado mezclado con 1 µL de buffer muestra. Las corridas electroforéticas se realizaron a 80 V por 40 minutos en buffer TAE. La visualización de bandas se realizó en una cámara-UV. Los datos obtenidos fueron registrados en las fichas de recolección.

2.1.8.2 Análisis estadístico

Una vez obtenida toda la información, se elaboró la base de datos y el análisis respectivo, el cual se realizó mediante Microsoft Excel 2013 y la prueba de concordancia mediante IBM-SPSS25.

Prueba de concordancia mediante el índice Kappa

Se obtuvo el valor de Kappa mediante el programa estadístico IBM-SPSS 25.

Índice kappa, según la escala de Cohen y Fleiss:

$K = 0-0,2$ Concordancia pobre.

$K = 0,21-0,4$ Concordancia débil.

$K = 0,41-0,6$ Concordancia moderada.

$K = 0,61-0,8$ Concordancia buena.

$K = > 0,8$ Concordancia muy buena.

2.1.10 Consideraciones éticas

- El estudio se realizó con la autorización del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé, del comité de ética institucional y del servicio de Microbiología, consiguiendo el dictamen institucional mediante el Expediente N° 011081-18-18.
- No se trabajó con las muestras hasta después de haber sido procesadas primeramente por el hospital. Una vez reportados los resultados, se recolectaron en medios de transporte.
- Cabe resaltar que en el estudio se codificaron los datos de los registros e historias clínicas para proteger la confidencialidad de la información. Por lo que se garantizó el anonimato de cada participante.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

DESCRIPCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS

En el presente estudio, se recolectaron un total de 100 aislados de *E. coli* productores de BLEE correspondientes al año 2018, de las cuales se incluyó 91 aislados. La principal causa de exclusión fue la ausencia de crecimiento en la reactivación en caldo CTS.

Según la información recopilada, los aislamientos pertenecieron a 78 mujeres (84,9%), de los cuales 18 (19,8%) fueron gestantes; y 13 varones (15,1%). Además, 29 aislados (31,9%) procedieron de hospitalización y 62 (68,1%) fueron ambulatorios.

Tabla 7. Distribución de los aislados según sexo y procedencia

Procedencia	Femenino		Masculino		Total	
	n1	%	n2	%	n total	%
Hospitalización	19	20,1%	10	11,8%	29	31,9%
Ambulatorio	59	64,8%	3	3,3%	62	68,1%
	78	84,9%	13	15,1%	91	100%

Las edades se distribuyeron entre 1 y 77 años. Se utilizó la clasificación de edades publicada por el Ministerio de salud (MINSA) para un mejor análisis de los resultados, dividiéndose las edades en 5 categorías: niños (0-11 años), adolescentes (12-17 años), jóvenes (18-29 años), adulto (30-59 años) y adulto mayor (60 a más).

Tabla 8. Presencia del gen *aac(6')-Ib-cr* según el sexo y procedencia

Procedencia	Femenino		Masculino		Total
	f ₁	%	f ₂	%	
Hospitalización	10	34,5 %	5	17,2 %	29
Ambulatorio	32	51,2 %	1	1,6 %	62
Total	42	87,5 %	6	12,5%	91

Se encontró que la frecuencia del alelo *aac(6')-Ib-cr* fue del 34,5% en mujeres y 17,2 % en pacientes hospitalizados, mientras que del 51,2% en mujeres y 12,5% en el caso de los pacientes ambulatorios.

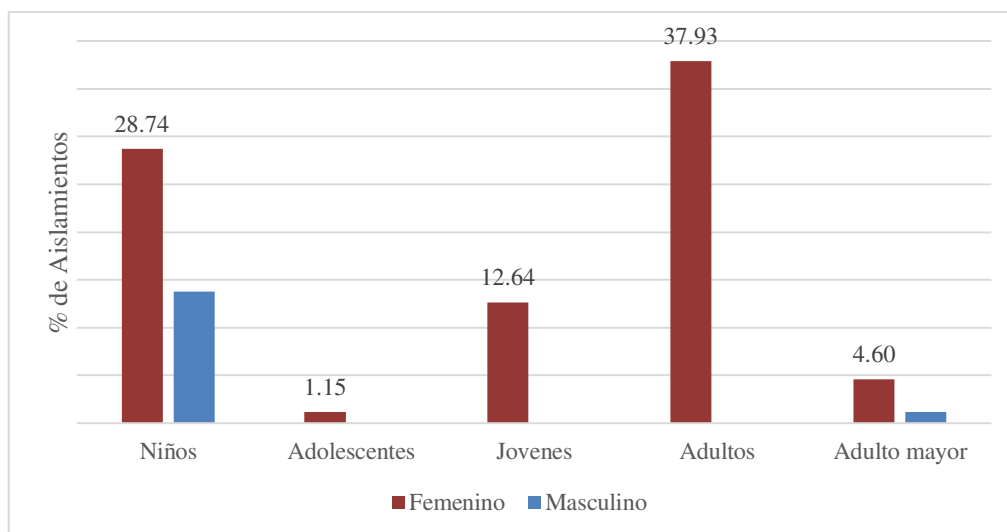


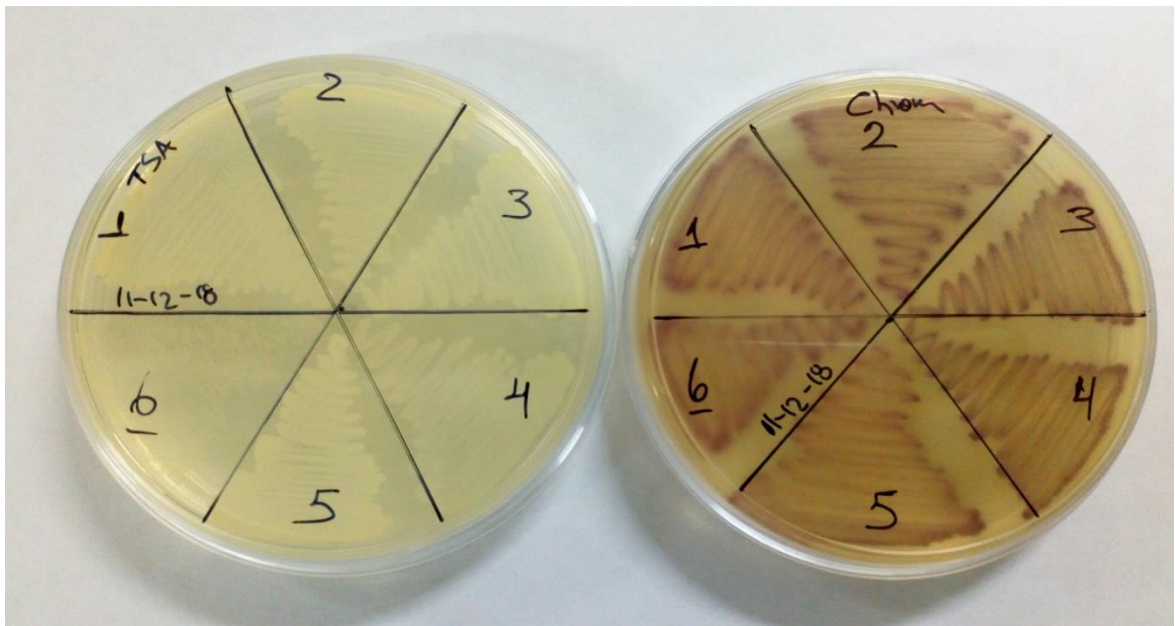
Gráfico 1. Distribución de las edades de los pacientes según el sexo.

Se observa del gráfico 1 que la presencia de *E. coli* es mayor en el sexo femenino con respecto al masculino en todas las edades; y, además, afecta al sexo masculino en mayor medida, en los primeros años de vida y en la adultez mayor.

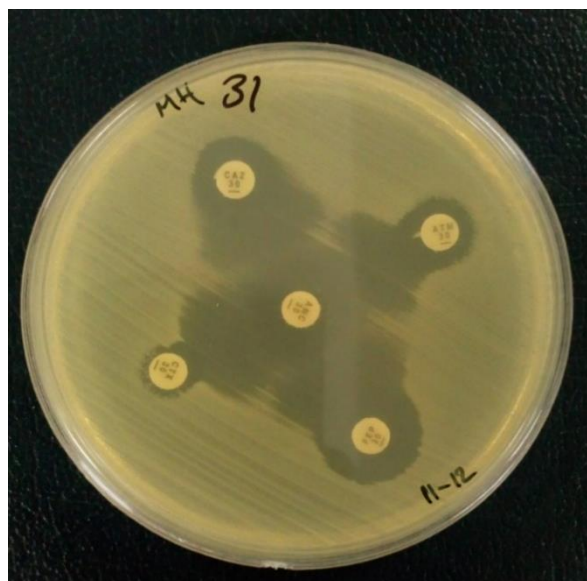
IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y DETECCIÓN FENOTÍPICA DE BLEE

Según el protocolo del hospital: Se emplearon los medios ázida, CLED y CHROMagar para la siembra y el aislamiento primario; y, por medio del equipo automatizado VITEK® 2 Compact, se identificaron los aislados como *E. coli* BLEE positivos.

Según el protocolo del estudio: Se realizó la confirmación por el método manual usando el medio cromogénico de la marca “CHROMagar®”, el cual muestra un color morado o rosado en presencia de la *E. coli* (fotografía 1). Además, se confirmó la presencia de BLEE por el método de Jarlier mostrándose en todos los aislados recolectados la figura de “cola de pez” o “efecto de huevo” como se puede ver en la fotografía 2.



Fotografía 1. Desarrollo de *E. coli* BLEE en agar TSA y CHROMagar.



Fotografía 2. Confirmación de BLEE de la *E. coli* código 31 por el método de Jarlier.

Se evidenció, en los 91 aislados, que la detección y confirmación fenotípica de BLEE por el sistema VITEK® 2 Compact fue comparable al 100% con la confirmación de producción de BLEE por el método de Jarlier. Asimismo, se encontró el 100% de congruencia con la identificación de *E. coli*.

PERFIL DE RESISTENCIA A QUINOLONAS

Se realizó el antibiograma manual por el método de Kirby-Bauer a los 91 aislados frente a los siguientes discos (fotografías 3 y 4). En la tabla 9, se muestra la alta resistencia hacia las quinolonas a excepción del cefoxitin y ertapenem.

Tabla 9. Susceptibilidad antibiótica mediante el método de Kirby-Bauer de los aislados (n= 91)

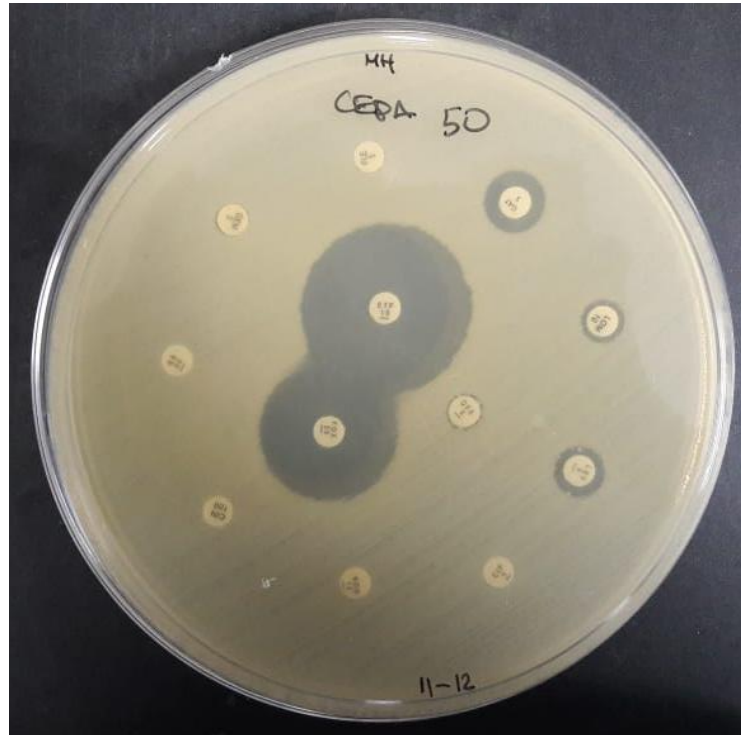
Antibióticos	[]	Clase	G°	Sensible		Intermedio		Resistente	
				f ₁	%	f ₂	%	f ₃	%
Ácido nalidíxico	30 µg	Q	1°	2	2	-	-	89	98
Cinoxacina	100 µg	Q	1°	3	3	3	3	85	94
Norfloxacin	10 µg	FQ	2°	10	11	1	1	80	88
Ciprofloxacina	5 µg	FQ	2°	8	9	3	3	80	88
Ofloxacina	5 µg	FQ	2°	11	12	-	-	80	88
Fleroxacina	5 µg	FQ	2°	10	11	1	1	80	88
Lomefloxacina	10 µg	FQ	2°	7	8	4	4	80	88
Levofloxacina	5 µg	FQ	3°	11	12	1	1	79	87
Gemifloxacina	5 µg	FQ	4°	7	8	4	4	80	88
Gatifloxacina	5 µg	FQ	4°	14	15	6	7	71	78
Cefoxitina	30 µg	CF	-	83	91	7	8	1	1
Ertapenem	10 µg	ERT	-	91	100	-	-	-	-

G°: Generación, []: Concentración, Q: Quinolonas, FQ: Fluoroquinolonas, CF: Cefamicinas, ERT: Ertapenem. Los diámetros y concentraciones de referencia se obtuvieron del Manual del CLSI 2018.

De la tabla 9, el grupo de quinolonas de 1° generación (ácido nalidíxico y cinoxacina) obtuvo la mayor resistencia, en contraste con la quinolona de 4° generación (gatifloxacina), la cual obtuvo la menor resistencia con respecto a las otras (ver fotografía 3).

El ácido nalidíxico presentó la menor sensibilidad (2%) y la mayor resistencia (98%), entre las 4 generaciones. Por el contrario, la gatifloxacina presentó la mayor sensibilidad (15%) y la menor resistencia (78%).

La ciprofloxacina y norfloxacina obtuvieron la misma resistencia (88%); sin embargo, hubo una discrepancia en las susceptibilidades intermedias y sensibles.



Fotografía 3. Antibiograma de quinolonas y no quinolonas para el aislado 50.

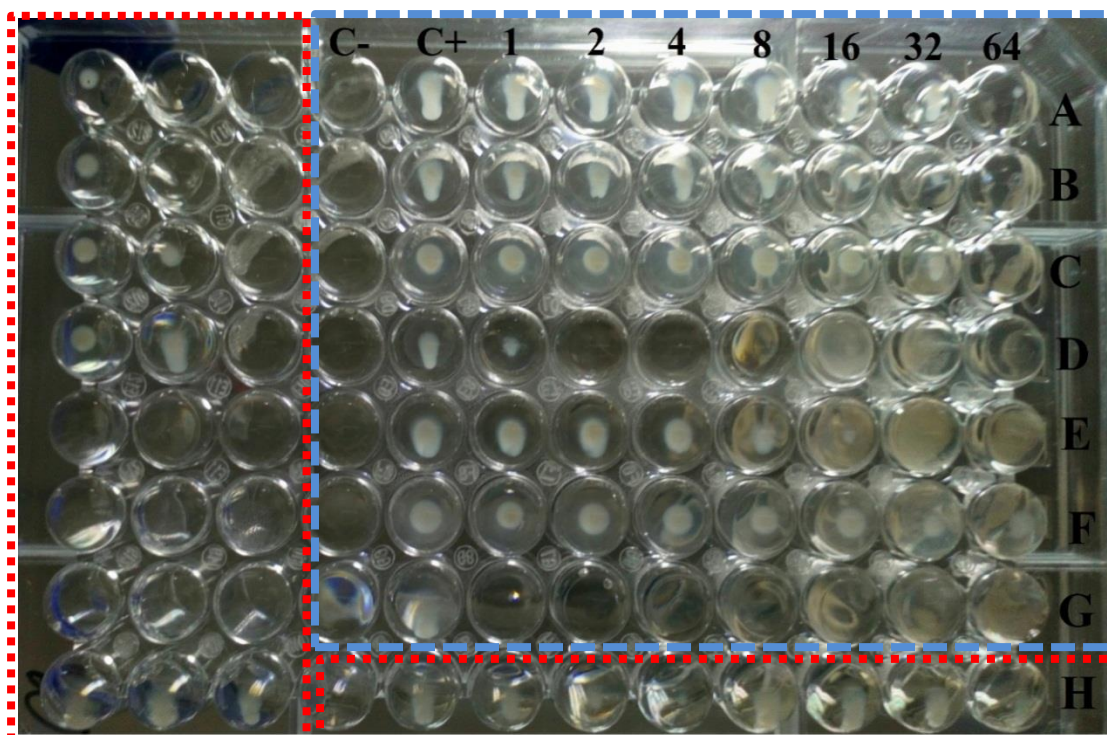
En la fotografía 3, se evidencia la alta resistencia que poseen los aislados frente a las quinolonas y fluoroquinolonas. Sin embargo, se observa una sensibilidad *in vitro* hacia cefoxitin y ertapenem. Se encontró este perfil en 67 (73,6%) aislados de *E. coli* BLEE positivos.

DETECCIÓN FENOTÍPICA DE LA ENZIMA *aac(6')-Ib-cr*

MIC- Norfloxacin en caldo M-H y L-B

Se realizó por el método de microdilución en L-B para hallar el MIC (norfloxacin), de acuerdo el método fenotípico propuesto por Kumar et al.⁴⁶, el cual tuvo una utilidad importante en la búsqueda de los aislados que portaban el alelo *aac(6')-Ib-cr*. En los anexos 2 y 3, se detalla el procedimiento realizado para hallar el MIC para norfloxacin, cabe mencionar que el caldo L-B (*en rojo*) obtuvo una lectura igual o similar al obtenido por el caldo M-H (*en azul*); sin embargo, en las guías del CLSI (2018) especifica al M-H como el único caldo enriquecido para la realización del MIC (fotografía 5).

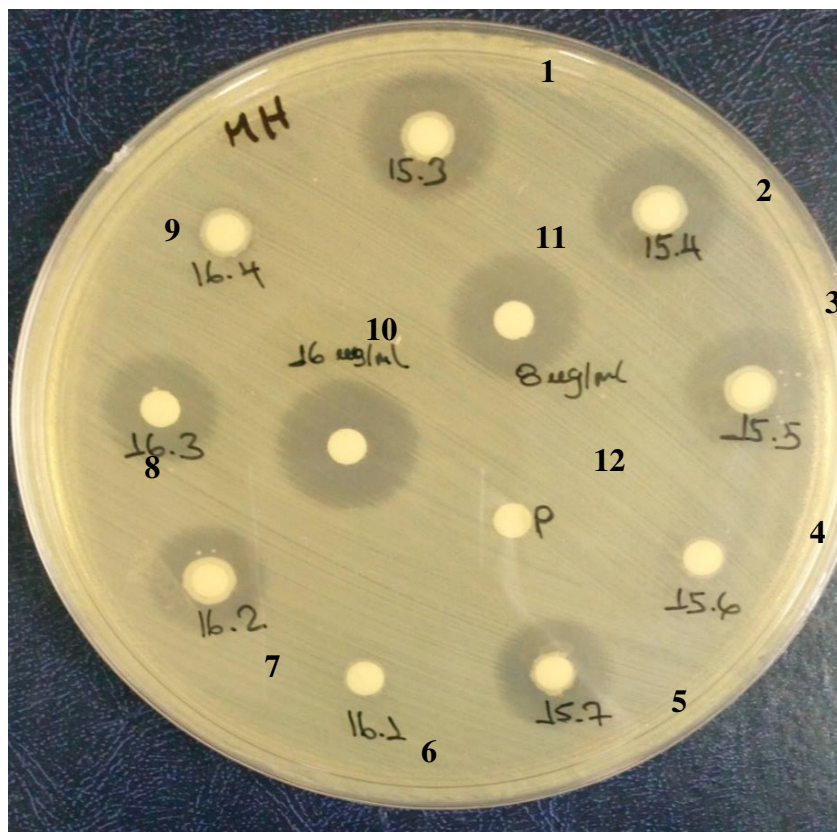
Los números designados en la parte superior de la fotografía 5 corresponden a las concentraciones del norfloxacin desde 64 hasta 1 µg/ml. Las letras asignadas desde A hasta la H en la parte lateral derecha son las filas correspondientes a cada muestra de estudio. Luego del hallazgo del MIC (intermedio= 8µg/ml), se procedió con la alícuota de los sobrenadantes de cada pocillo en los discos en blanco estériles dispuestos en una placa de M-H hisopado previamente con la *E. coli* ATCC. En el anexo 2, se detallan las posiciones empleadas para cada caldo enriquecido.



Fotografía 5. Hallazgo del MIC para norfloxacin con los caldos M-H y L-B realizado en el IMT DAC-UNMSM.

Detección de la enzima *aac(6')*-Ib-cr mediante disco difusión (DD)

En la fotografía 6, se muestran las 12 posiciones utilizadas para la detección de la enzima *aac(6')*-Ib-cr en una placa de agar M-H de 15 cm, cabe mencionar que cada placa contenía 3 discos en blanco para el control negativo (disco 10), control de antibiótico (disco 11) y control positivo (disco 12). Por consiguiente, los discos restantes fueron destinados para las muestras problema. En el anexo 3, se detalla el procedimiento con mayor detalle. Se detectó la enzima *aac(6')*-Ib-cr en 47 aislados (52%).



Fotografía 6. Prueba fenotípica para la detección de la enzima Aac-(6')-Ib-cr. Placa de M-H de 15 cm hisopado con *E.coli* ATCC 25922, se dispusieron 12 discos en blanco: 1 de control positivo, 1 de control negativo y 1 control de 8 µg/ml de norfloxacin y los demás fueron discos para las muestras.

Tabla 10. Frecuencia de la enzima aac(6')-Ib-cr en relación con las susceptibilidades a ciprofloxacina y norfloxacina por el método de Kirby-Bauer. (n= 91)

Antibiótico	Resultado	Screening de la enzima aac(6')-Ib-cr	
		Positivo	Negativo
Norfloxacina	Sensible	-	10 (11 %)
	Intermedio	-	1 (1 %)
	Resistente	47 (52 %)	33 (36 %)
Ciprofloxacina	Sensible	-	8 (9 %)
	Intermedio	-	3 (3 %)
	Resistente	47 (52 %)	33 (36 %)

Se encontró la enzima aac(6')-Ib-cr en 47 aislados (52%) resistentes tanto a ciprofloxacina como norfloxacina, mientras que otros 33 (36%) aislados que fueron resistentes a los antibióticos mencionados resultaron negativos a la enzima aac(6')-Ib-cr.

Prueba de concordancia mediante el índice Kappa

Se obtuvo el valor de Kappa mediante el programa estadístico IBM-SPSS 25

Tabla 11. Concordancia entre el fenotipo vs PCR-RFLP *aac(6')-Ib-cr*

		PCR-RFLP <i>aac(6')-Ib-cr</i>		Total
		Negativo	Positivo	
Fenotipo <i>aac(6')-Ib-cr</i>	Negativo	43	1	44
	Positivo	0	47	47
Total		43	48	91

Tabla 12. Medidas simétricas

		Valor	Error estándar		Significación aproximada
			asintótico ^a	T aproximada ^b	
Medida de acuerdo	Kappa	0,978	0,022	9,332	0,000
N de casos válidos		91			

Finalmente, se obtuvo un Kappa ($K=0,978$), el cual se interpreta como una concordancia muy buena entre el fenotipo y el PCR-RFLP para la variante de acetilasa.

DETECCIÓN DE RESISTENCIA ACOMPAÑANTE

Se recolectaron los resultados del VITEK® 2 Compact en la gráfica 2, en esta se observa la multirresistencia que relaciona a los aislados BLEE, sobre todo la resistencia en las fluoroquinolonas representadas por la ciprofloxacina (87%), norfloxacina (87%) y moxifloxacina (92%).

También se observa, una resistencia en los aminoglucósidos representados por la gentamicina y tobramicina, siendo el caso de la amikacina el único de esta familia con una alta sensibilidad (96%).

Además, en el caso del trimetropim-sulfametoxazol (SXT) muestra una resistencia del 89%. En contraste con los carbapenémicos (ertapenem, meropenem e imipenem) y el tigeciclina describen una sensibilidad del 100% y 98%, respectivamente.

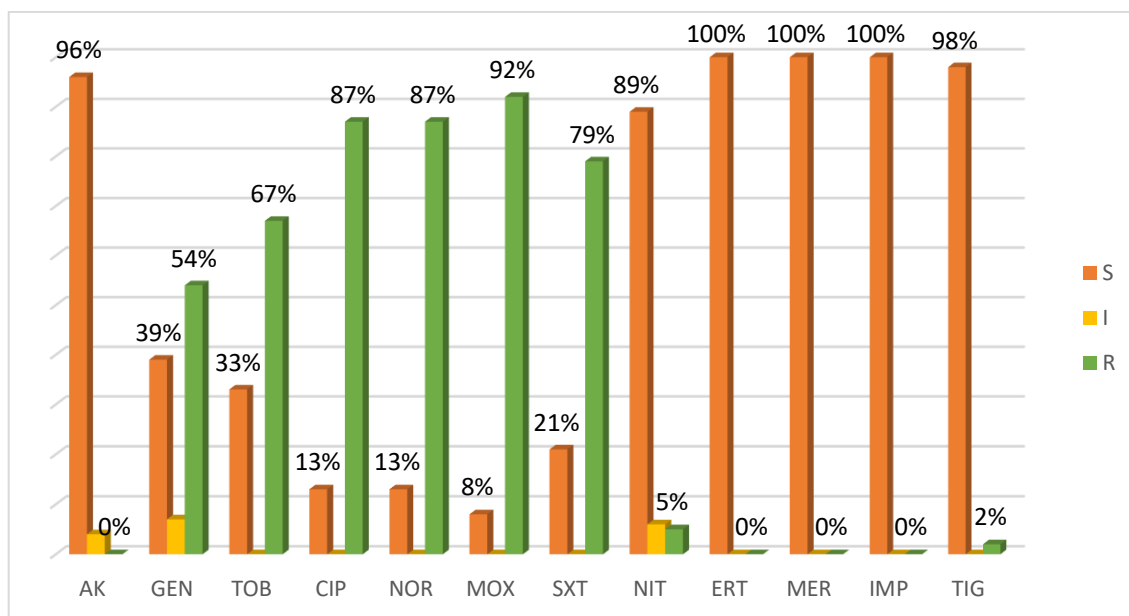
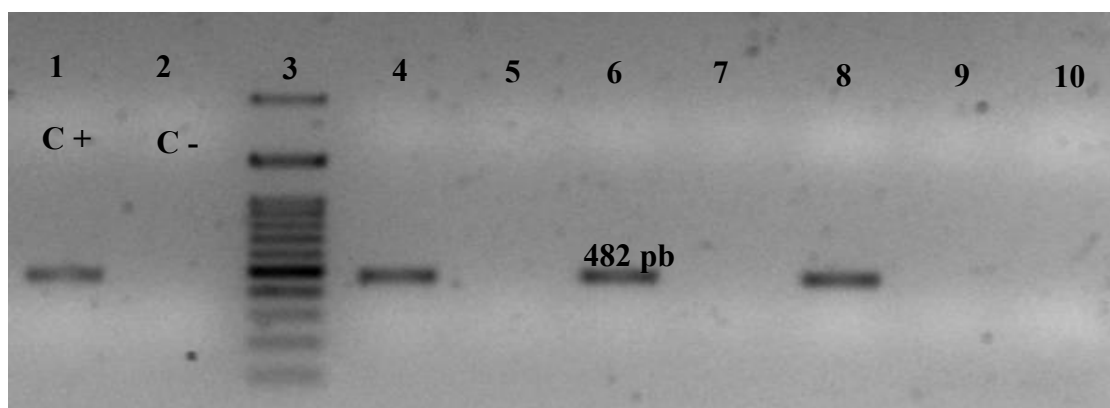


Gráfico 2. Distribución de antibióticos según el reporte de MIC del equipo VITEK. S: Sensible; I: Intermedio; R: Resistente. AK: Amikacina, GEN: Gentamicina, TOB: Tobramicina, CIP: Ciprofloxacina, NOR: Norfloxacina, MOX: Moxifloxacina, SXT: Sulfonamidas, NIT: Nitrofurantoína, ERT: Ertapenem, MER: Meropenem, IMP: Imipenem y TIG: Tigeciclina.

DETECCIÓN DEL GEN *aac(6')-Ib-cr* MEDIANTE PCR/PCR-RFLP

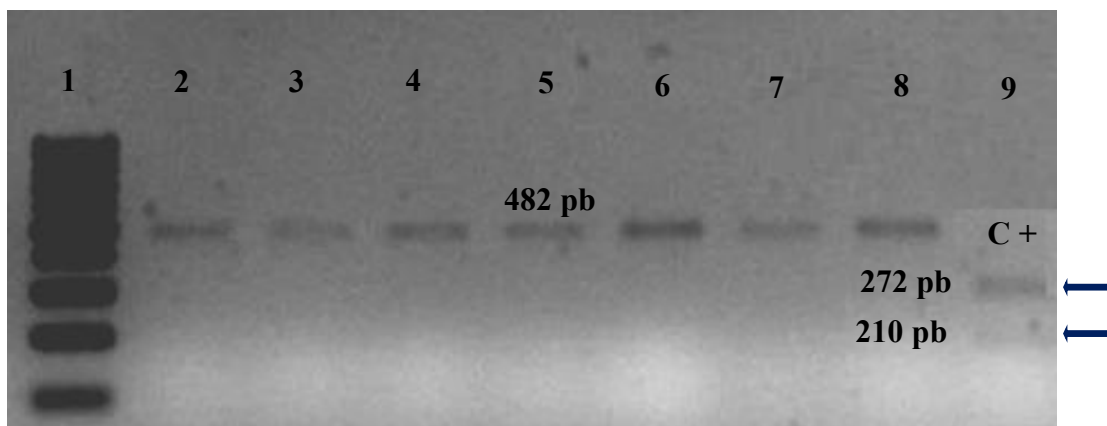
*Detección del gen *aac(6')-Ib* mediante PCR*

En 48 de 91 aislados (53%) de *E. coli* se obtuvo amplificación positiva para *aac(6')-Ib*. En la fotografía 7, se muestran algunos de los resultados.



Fotografía 7. Amplificación del alelo *aac(6')-Ib-cr* en las *E. coli* BLEE. Carril 1: Control positivo, carril 2: Control negativo (H₂O), carril 3: Ladder de 100 bp, carril 4, 6 y 8: *E. coli* portadores del gen *aac(6')-Ib* (482 pb).

Detección del alelo variante aac(6')-Ib-cr mediante PCR-RFLP

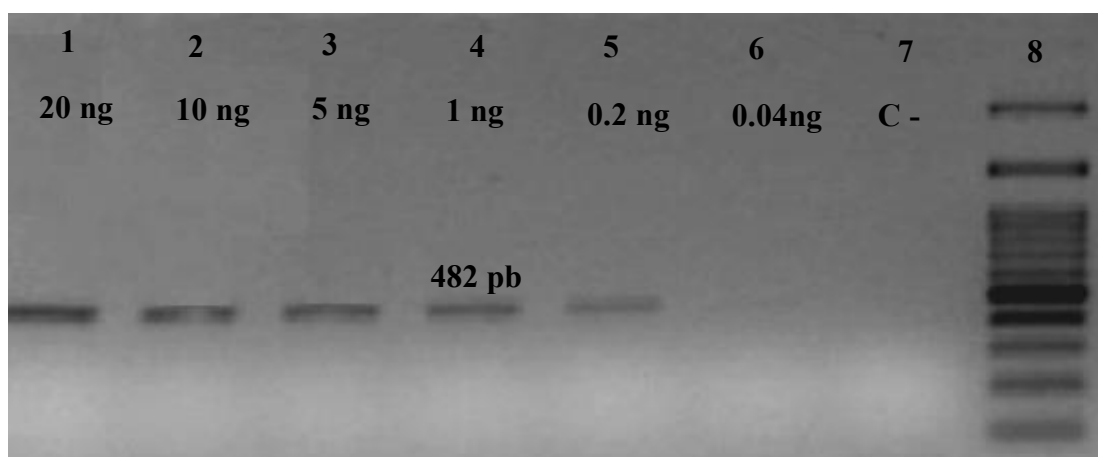


Fotografía 8. PCR-RFLP mediante digestión con la enzima BtsCI de los amplicones de *aac(6')-Ib*. Carril 1: Ladder de 100 bp, carril 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8: *E. coli* portadores del gen *aac(6')-Ib-cr*, carril 9: Control positivo de *E. coli* portador del gen *aac(6')-Ib*.

Para la diferenciación de los alelos *aac(6')-Ib* y *aac(6')-Ib-cr*, se realizó una digestión enzimática con BtsCI. Esta enzima es capaz de cortar el producto *aac(6')-Ib*, pero no su variante. Si luego de la digestión se observa una banda de 482 pb (tamaño del amplicón), corresponde al producto de amplificación de *aac(6')-Ib-cr*. Por otra parte, si se observa dos productos (210 pb y de 282 pb), corresponden a *aac(6')-Ib*. De los 48 amplicones, 48 (100%) aislamientos correspondieron a la variante *aac(6')-Ib-cr*. En la fotografía 8, se visualizan algunos de los resultados obtenidos.

*Límite de detección de la PCR-gen *aac(6')*-Ib*

En la fotografía 9, se calculó el límite de detección para hallar la concentración mínima de ADN bacteriano para la óptima amplificación del gen *aac(6')*-Ib. El cual fue de 0,2 ng/μL de ADN por muestra, siendo esto medido y calculado en el equipo de NANODROP ONE (Thermo Scientific) del IMT DAC/LEMYG-CITBM.



Fotografía 9. Límite de detección para la amplificación del gen *aac(6')*-Ib. Carril 1: 20 ng, carril 2: 10 ng, carril 3: 5 ng, carril 4: 1 ng, carril 5: 0,2 ng, carril 6: 0,04 ng de amplicones de *aac(6')*-Ib.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, se ha podido resaltar la presencia del alelo *aac(6')-Ib-cr* en los aislados de *E. coli* BLEE mostrando, además, un patrón de resistencia amplio. Esto resulta alarmante para la salud pública, debido a que los antibióticos no logran ejercer ninguna acción *in vitro*, incluso algunos antibióticos inducen a la expresión de otros mecanismos de resistencia que limitan e impiden la terapia farmacológica, lo cual conlleva a crecientes tasas de morbilidad y mortalidad.

Los aislamientos recolectados correspondieron a un 84,9% en mujeres y un 15,1% en hombres, siendo el sexo femenino el grupo más afectado, como reporta Yabar et al. ⁽⁶⁾; asimismo, el 15,1% de aislados encontrados en el sexo masculino corresponden solo a las etapas de niñez y adultez mayor, esto corrobora lo mencionado por Lee et al. ⁽²⁰⁾ y Rodrigo et al. ⁽²¹⁾ acerca de las modificaciones anatómicas y fisiológicas que desarrollan los hombres al volverse susceptibles de adquirir una ITU en la infancia, así como en la etapa de la adultez mayor.

En cuanto a la susceptibilidad antibiótica por el método de Kirby-Bauer se encontró una resistencia del 98% para AN, un 88% para CIP, un 88% para NOR y un 87% para LEV. Estos resultados se asemejan a los obtenidos, en Bolivia, por Saba et al. ⁽¹⁵⁾ que encontraron el 91% de resistencia a AN, el 90% de resistencia a CIP, y el 89% a LEV. En el Medio Oriente se tienen referencias comparables, como el de Al-Mayahie et al. ⁽⁵⁸⁾ que encontraron una resistencia del 70,5% en AN y 50% a CIP; otro estudio realizado en el mismo continente por Eshwarappa et al. ⁽⁵⁹⁾ demostró una resistencia del 74,1% para CIP y NOR. Y en nuestro país, en el estudio de Yabar et al. ⁽⁶⁾ se halló una resistencia cercana del 58% a CIP.

Por otro lado, en un estudio realizado en Colombia por Blanco et al. ⁽⁶⁰⁾ todos los aislamientos tuvieron una sensibilidad mayor al 90% frente a ERT, NIT y AK. Asimismo, en Arabia Saudita, Al-Mijalli ⁽⁶¹⁾ mostró una sensibilidad alta del 98,9% en AK, MER, IMI y ERT. En contraste con nuestro estudio, describió una sensibilidad cercana con las referencias en mención, siendo para AK 96%, para MER 100%, para IMI 100% y para ERT 100%.

En lo que respecta al FOX, este es útil como indicador ante la presencia de las betalactamasas tipo AmpC; siendo así, en el estudio de Saba et al. ⁽¹⁵⁾ reportó 5 aislados

con sensibilidad intermedia (5/87) a FOX a los cuales se descartó la presencia de enzimas AmpC por PCR multiplex y por medio de disco difusión (FEP y AMC). En la publicación de Martínez et al. ⁽⁶²⁾, se describe la ausencia de las AmpC cuando existe sensibilidad por disco difusión en AMC y FEP. De manera semejante a lo reportado por Saba et al. ⁽¹⁵⁾, en nuestro estudio se encontró 9 aislados intermedios (9/91) a FOX, esto descartó la presencia de enzimas tipo AmpC debido a las sensibilidades desarrolladas para FEP y AMC.

Según J. Casellas ⁽⁴⁶⁾, el uso de la CIP en el medio hospitalario la convierte en una selectora de aislados productores de BLEE. Además, el autor afirma que debe prestarse atención a las bacterias productoras de BLEE tipo CTX-M, ya que estas se seleccionan como resistentes a CRO y CIP. En cuanto a las infecciones por bacterias BLEE que tengan sensibilidad aparente a FOX o colistin (COL) no deben de emplearse, ya que selecciona rápidamente mutantes, como es el caso de la FOX al producir mutantes deficientes en porinas.

Por otra parte, en cuanto a la detección fenotípica de la enzima *aac(6')-Ib-cr*, Kumar et al. ⁽⁵³⁾ en su protocolo, recolectaron aislamientos de enterobacterias entre productoras de BLEE y no BLEE, siendo además resistentes a CIP y NOR; en dicho estudio encontraron el 53,91% con la enzima *aac(6')-Ib-cr*. Paralelamente con nuestro estudio encontramos un 51,6% (47/91) de aislados positivos a la enzima, esta cifra corresponde a los primeros hallazgos en la referencia nacional (anexo 3).

Con respecto a la detección por PCR del alelo *aac(6')-Ib-cr*, se encontró un 52,7% en los aislados de *E. coli* BLEE positivos, siendo además el único alelo. Este resultado se aproxima al estudio realizado por Rincón et al. ⁽¹⁶⁾ quienes describieron, en tres lugares de recolección, la presencia del alelo: en Argentina lo detectaron en un 38,6% de aislados; en Colombia, en un 65,2%; y en Perú, en un 55%. Cabe resaltar que se encontró una frecuencia nacional del 50,4% del gen *bla_{CTX-M}* en un estudio realizado en el INSN ⁽⁵⁰⁾, siendo esta cifra comparable con el 53% obtenido en esta investigación y también comparable con el 55% encontrado por Rincón et al. ⁽¹⁶⁾; ya que se sabe que el alelo *aac(6')-Ib-cr* se ubica en el mismo plásmido con los genes *bla_{CTX-M}*. En Bolivia se encontraron 2 estudios: Saba et al ⁽¹⁵⁾ encontró el alelo en el 83% de aislados de *E. coli* BLEE, otro reporte de Goudarzi et al. ⁽¹⁷⁾ en aislamientos de *E. coli* BLEE positivos

solo encontraron en el 74,7% el alelo *aac(6')-Ib*. En Chile Elgorriaga et al. ⁽¹⁴⁾ encontraron un 74% de aislados de *E. coli* BLEE portando el alelo; sin embargo, encontraron que tres de estos portaban los 2 alelos. En EEUU, Park et al. ⁽¹⁰⁾ describieron un 32% de aislados de *E. coli* BLEE.

En el presente estudio, el 53% de los aislados *E. coli* BLEE presentó el alelo *aac(6')-Ib-cr*, el cual contrasta con los resultados obtenidos en países de otros continentes, como en Europa, el estudio de Fihman et al. ⁽⁸⁾ (Francia) quienes reportaron un 60%. En Asia, los estudios realizados por Jiang et al. ⁽⁹⁾ encontraron un 8%; y por Yang et al. ⁽¹²⁾ encontraron el 18,3% del alelo variante en los aislados de *E. coli* BLEE (China). En el estudio de Kim et al. ⁽⁶³⁾ (Corea) encontraron que el 45% portaban el alelo *aac(6')-Ib*; el 34%, portaban el alelo variante *aac(6')-Ib-cr*; y el 21% portaban los 2 alelos.

Según la red de WHONET ⁽⁶⁴⁾, se describe un protocolo para la detección de sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas, y en esta se describe la detección de la enzima *aac(6')-Ib-cr* empleando los discos de AN y CIP. Este método plantea que si un aislado bacteriano posee un halo ≥ 21 mm para AN y un halo entre 21 a 30 mm para CIP, el aislado tendría una sospecha de producir la enzima *aac(6')-Ib-cr*. En nuestro estudio encontramos dos únicos aislados con estas características (AN₁₅=21 y CIP₁₅=27) y (AN₂₉=24 y CIP₂₉=30); sin embargo, ambos no presentaron el gen en mención (Anexo 4). Según Navarro et al. ⁽⁶⁵⁾ cuando se evidencie una sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas, para que sean sensibles al ácido nalidíxico, esto se relaciona con la presencia de genes plasmídicos. Con respecto a la sensibilidad del CIP en los 2 aislados del estudio no disminuyó, por lo tanto no se encontró el alelo variante. Por otra parte, Andrés et al. ⁽⁴³⁾ proponen un método fenotípico para la detección de la enzima *aac(6')-Ib-cr* por medio de disco difusión. Así pues, una diferencia ≥ 5 mm entre los halos de inhibición del LEV y CIP, [Δ LEV-CIP], es un fuerte predictor de la presencia de *aac(6')-Ib-cr*. Cabe agregar, que un incremento en el MIC de CIP con respecto al de LEV también es un buen predictor.

Es importante recalcar que el método de Andrés et al. ⁽⁶⁵⁾ pierde utilidad cuando el CIP no tiene halo de inhibición o la LEV tenga halo ≤ 10 mm. Sin embargo, la detección

de la enzima *aac(6')-Ib-cr* se convierte clínicamente irrelevante en los casos que existe marcadamente una alta resistencia a fluoroquinolonas. En nuestro estudio, solo encontramos 1 aislado con una (Δ LEV-CIP) de 5 mm; sin embargo, resultó negativo al gen en estudio. Cabe destacar también que se encontraron aislados positivos al gen con un Δ LEV-CIP ≥ 0 (Anexo 4) difiriendo del valor señalado. Además, la resistencia a fluoroquinolonas fue alta en nuestro estudio, por lo que, según la referencia, pierde su utilidad cuando se aplica en aislados con multirresistencia; por otra parte, en estudios que abordan enterobacterias en general (BLEE y No BLEE), estos métodos fenotípicos tendrían una mejor utilidad.

Asimismo, Navarro et al. ⁽³⁷⁾ describen las susceptibilidades hacia AN y CIP para generar 3 características fenotípicas diferentes: cuando hay una resistencia de alto nivel a AN (MIC > 32 μ g/mL) y sensibilidad a CIP, en este caso se puede sospechar que existe una mutación ya establecida en *gyrA*, cumpliendo estos criterios en 6 aislados del presente estudio. En el segundo caso, se describe una resistencia de alto nivel en AN y sensibilidad intermedia o resistente a CIP (MIC > 1 μ g/mL), y se presume de al menos 2 mutaciones en *gyrA* o *parC*, con este criterio hemos encontrado 83 aislados; ello implicaría una resistencia a todas las fluoroquinolonas, a pesar que *in vitro* muestre una sensibilidad aparente. Asimismo, la resistencia en este caso conlleva estrictamente a una sensibilidad disminuida a las demás fluoroquinolonas. Por último, en el tercer caso se tiene una sensibilidad disminuida al AN (MIC 16-32 μ g/mL) y CIP (0,25-1 μ g/mL). Este fenotipo sugiere con alta probabilidad la presencia de genes *qnr* u otros tipos de genes plasmídicos, como el *aac(6')-Ib-cr*, esto sin alteraciones adicionales a nivel de las topoisomerasas (contando con estos criterios en 2 aislados). Cabe mencionar, que en estos 2 últimos aislados no se encontró el gen *aac(6')-Ib-cr*, sin embargo podría haber la posibilidad de encontrarse otro gen plasmídico como *qnr* o *qep*.

También es importante remarcar la sensibilidad a AK presente en algunos aislados positivos al gen *aac(6')-Ib-cr* y, que a pesar de esta sensibilidad aparente, convierten *in vitro* a la AK en la mejor terapéutica frente a los gérmenes multirresistentes abordados en el estudio. Sin embargo, los antibióticos GEN y TOB no fueron sensibles, ya que resultaron con una sensibilidad intermedia o resistente.

En otra publicación, Navarro et al. ⁽³⁷⁾ mencionan al fenotipo de resistencia en aminoglucósidos correspondiente cuando un aislado sea sensible a AK, pero con una sensibilidad intermedia o resistente a TOB; cuando se encuentre este caso, debe interpretarse como sensibilidad intermedia a AK, ya que puede tratarse de la producción de la enzima aac(6')-Ib-cr, la cual tiene más afinidad con TOB que con la AK. En esta parte se logra inferir que, a pesar de un antibiograma con una sensibilidad aparente hacia AK, se tiene que evaluar la sensibilidad en al menos tres antibióticos (NET, TOB y GEN) para definir la sensibilidad hacia AK.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- La frecuencia del gen *aac(6')-Ib* fue del 53%.
- La frecuencia del alelo *aac(6')-Ib-cr* fue del 53% obtenido mediante RFLP.
- Se comprueba la hipótesis descriptiva.
- Los aislamientos analizados productores de BLEE presentaron altos niveles de resistencia a CIP y NOR siendo en ambos del 88%.
- De los aislados resistentes a ciprofloxacina y norfloxacina, el 53% fueron portadores del alelo *aac(6')-Ib-cr*.

RECOMENDACIONES

- El método sugerido por la red WHONET, así como el método correspondiente a la Δ LEV-CIP ≥ 5 mm, para la detección fenotípica de la enzima aac(6')-Ib-cr, implica utilidad en microorganismos con sensibilidad o sensibilidad disminuida a quinolonas. Sin embargo, debería actualizarse cuando se aplique en microorganismos multirresistentes como los productores de BLEE.
- Se debe optimizar el empleo del método fenotípico para la enzima aac(6')-Ib-cr, y conseguir una estandarización en pasos y tiempos reducidos.
- Se recomienda la tipificación adicional de los genes CTX-M, SHV y TEM, debido a la asociación que estas tienen con los genes PMQR.
- Asimismo, detectar las mutaciones cromosomales en las regiones QRDR de la DNA girasa y la topoisomerasa IV, relacionándolas con la presencia de los PMQR.
- Al realizar la interpretación de la sensibilidad hacia amikacina, y si adicionalmente es resistente a tobramicina, se deberá reportar la amikacina como sensibilidad intermedia.
- Asimismo, se sugiere emplear la resistencia a tobramicina como predictor de la enzima aac(6')-Ib-cr.

Referencia bibliográfica

1. Echevarria J, Sarmiento E, Osoreo F. Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. Acta Med Per. 2006; 23(1): p. 26-31.
2. Albert Hernandez M. Estudio de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas de localización plasmídica en aislamientos clínicos de enterobacterias en la Región de Murcia. Tesis doctoral. Universidad de Murcia-España., Facultad de Biología.; 2013.
3. Alvarez D, Garza G, Vasquez R. Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia.. Rev Chilena Infectol. 2015.; 32(5): p. 499-504.
4. Magiorakos A, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, et al. Multidrug-resistant, extensively drug resistant and Pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012; 18: p. 268-281.
5. Arce Z, Llontop J, Alarcon E, Lopez E. Detección de los genes SHV, TEM Y CTX-M en cepas de *Escherichia coli* b-lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo-Perù. Rev cuerpo med. HNAAA. 2014; 7(3).
6. Yabar M, Curi B, Torres C, Calderon R, Riveros M, Ochoa T. Multirresistencia y factores asociados a la presencia de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* provenientes de urocultivos. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2017; 34(4): p. 660-5.

7. Toribio J, Sevilla CR, Gonzales E. Marcadores de resistencia plasmidica a quinolonas *qnr* en aislamientos clinicos de enterobacterias productoras de betalactamasas CTX-M en Lima-Perú. Rev PERU MED EXP SALUD PUBLICA. 2019; 36(2): p. 265-9.
8. Fihman V, Lartique MF, Jacquier H, Meunier F, Schnepf N, Raskine L, et al. Appearance of *aac(6')-Ib-cr* gene among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a French hospital. J Infect. 2008; 56(6).
9. Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008; 61: p. 1003-6.
10. Park CH, Robicsek A, Jacoby G, Sahm D, Cooper D. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* Encoding a ciprofloxacin-Modifying Enzyme. ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER. 2006; 50: p. 3953-3955.
11. Jouini A, Slama KB, Vinué L, Ruiz E, Saénz Y, Somalo S, et al. Detection of Unrelated *Escherichia Coli* Strains Harboring Genes of *CTX-M-15*, *OXA-1*, and *AAC(6')-Ib-Cr* Enzymes in a Tunisian Hospital and Characterization of Their Integrons and Virulence Factors. Journal of Chemotherapy. 2010; 22(5): p. 318-23.
12. Yang H, Chen H, Yang Q, Chen M, Wang H. High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* from Nine Teaching Hospitals in China. Antimicrobial Agents Chemoter. 2008; 52(12): p. 4268-4273.

13. Frasson I, Cavallaro A, Bergo C, Richter S, Palú G. Prevalence of *aac(6')-Ib-cr* plasmid-mediated and Chromosome-Encoded fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae* in Italy. *Gut Pathogens*. 2011; 3(12).
14. Elgorriaga E, Guggiana P, Dominguez M, Gonzales G, Mella S, Labarca J, et al. Prevalencia del determinante de resistencia plasmídica a quinolonas *aac(6')-Ib-cr* en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas en diez hospitales de Chile. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012; 30(8): p. 466-68.
15. Saba Villarroel PM. Caracterización de los determinantes de resistencia a β -Lactámicos y quinolonas de localización plasmídica en Enterobacterias. Tesis de Maestría. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2014.
16. Rincon G. Genes de Resistencia a Quinolonas de Localizacion Plasmidica en *Enterobacteriaceae*. Tesis doctoral. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2015.
17. Goudarzi M, FazeliMaryam. Quinolone Resistance Determinants *qnr*, *qep*, and *aac(6')-Ib-cr* in Extended-Spectrum B-Lactamase producing *Escherichia coli* Isolated From Urinary Tract Infections in Tehran, Iran.. *Shiraz E-Med J*. 2017; 18(5).
18. Garcia C, Banda C, Mejia F, Seas C. Guía de Práctica Clínica de Infección del Tracto Urinario (ITU). Publicación. Lima: Hospital Nacional Cayetano Heredia., Departamento de Enfermedades Infecciosas, Tropicales y Dermatológicas.; 2015.
19. Anton Jimenez M, Esteban Saiz R, Ortes Gomez R. Tratado de Geriatria. Infección Urinaria.

20. Lee H, Lie J. Urinary Tracts Infections. Infectious Diseases. 2018; 1: p. 7-28.
21. Rodrigo C, Mendez M, Azuara M. Infección Urinaria. In Protocolos diagnóstico-terapéuticos de la AEP: Infectología pediátrica. Barcelona p. 125-134.
22. Stamm W, Hooton T. Management of urinary tract infections in adults. N Engl J Med. 1993; 329(18): p. 1328-1334.
23. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Will W. Diagnóstico Microbiológico. Sexta ed.: Panamericana; 2008.
24. Wiles T, Kulesus R, Mulvey M. Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. Exp Mol Pathol. 2008; 85(1): p. 105-15.
25. Parvez SA, Rahman D. Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli*. In Microbiology of Urinary Tract Infections-Microbial Agents and Predisposing Factors.; 2018. p. 7-21.
26. Krause K, Serio A, Timothy K, Connolly L. Aminoglycosides: An overview. CSH perspectives in Medicine. 2016; 6.
27. Palomino J, Pachón J. Aminoglucósidos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003; 21: p. 105-15.
28. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby G, Macielag M, Abbanat D, Park C, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med. 2006; 12: p. 83-88.
29. Campos A, Martinez M, Mendoza N. Quinolonas. Rev. Fac Med UNAM. 2008; 51(4).

30. Alos I. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; 21(5): p. 261-8.
31. Bush K, Bradford P. b-Lactams and b-Lactamase Inhibitors: An overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Jun.
32. Zagursky R, Pichichero M. Cross-reactivity in β -Lactam Allergy. *ELSEVIER*. 2018; 6(1).
33. Fica A. Resistencia Antibiotica en Bacilos Gram Negativos, Cocáceas Gram Positivos y Anaerobios. Implicancias Terapeuticas. *Rev Med Clin CONDES*. 2014; 25(3): p. 432-444.
34. Suarez C, Gudiol F. Antibióticos betaláctamicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27(2): p. 116-129.
35. GRUNBAUM F. RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS EN *ENTEROBACTERIACEAE*. Tesis doctoral. Barcelona.: Universidad Autónomas de Barcelona., Departamento de Genética y de Microbiología.; 2011.
36. Leyva S, Leyva E. Fluoroquinolonas. Mecanismos de accion, estructura, sintesis y reacciones fisicoquimicas importantes para propiedades medicinales. *Sociedad Quimica de Mexico*. 2008; 2(1): p. 1-13.
37. Navarro Risueño F, Miro Cardona E, Mirelis Otero B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 20010; 28: p. 638-635.
38. Zarate S, De la cruz ML, Benito R, Revuelta J, Santana A, Bastida A. Overcoming Aminoglycoside Enzimatic Resistance: Design of Novel Antibiotic an Inhibitors. *Molecules*. 2018; 23(284).

39. Chavez V, Ramirez M, Silva J, Cervantes C. Resistencia Bacteriana a Quinolonas: Determinantes codificados en Plásmidos. *REB*. 2015; 34(1): p. 4-9.
40. Redgrave L, Suttom S, Webber M, Piddock L. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*. 2014; 22(8): p. 438-45.
41. Hernandez A. Estudio de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas de localización plasmídica en aislamientos clínicos de enterobacterias en la Región de Murcia.. Tesis doctoral. Universidad de Murcia-España., Facultad de Biología.; 2013.
42. Marchetti M, Errecalde J, Mestorino N. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. Impacto en la multirresistencia. *ANALECTA VET*. 2011; 31(2): p. 40-53.
43. Andres P, Lucero C, Soler A, Guerriero L, Albornoz E, Tran T, et al. Differential Distribution of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Enterobacteria with Unusual Phenotypes of Quinolone Susceptibility from Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013; 57(6): p. 2467-2475.
44. Navarro F, Miro E. Entorno genético de las BLEE: implicaciones en la transmisión. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007; 25(2): p. 11-17.
45. Lee J, Bae I. New definitions of extended-spectrum β -lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. *Med. Res. Rev*. 2012; 32(1): p. 216-32.
46. Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Publica*. 2011; 30(6): p. 519-28.

47. Lezameta L, Gonzales E, Tamariz J. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Rev. Perú Med Exp Salud Publica*. 2010; 27(3): p. 345-51.
48. Diestra K. Caracterización del entorno genético de genes bla_{BLEE} y plásmidos asociados en cepas circulantes de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en España. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona., Departamento de genética y microbiología; 2010.
49. Gonzales G, Mella S, Zemelman R, Bello H, Dominguez M. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev Med Chile*. 2004; 132: p. 619-626.
50. Detección y caracterización molecular de B-lactamasas de espectro extendido en *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas en el Instituto Nacional de Salud del Niño. Publicación. Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima; 2015.
51. Di Conza J, Gutkind G. Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología*. 2010; 42: p. 63-78.
52. Rivera JM, Rodríguez UC, Flores CR, Serquen LL, Arce GZ. Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella spp* y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2015; 32(4): p. 752-5.
53. Kumar S, Bandyopadhyay M, Bandyopadhyay M, Mukhopadhyay P, Chatterjee M, Das S, et al. Phenotypic Detection of AAC(6')-Ib-Cr Expression in *Enterobacteriaceae* Isolates. *IOSR-Journal of Dental and Medical Sciences*. 2016; 15(8).

54. Garcia A, Garcia E, Hernandez , A, Ruiz J, Yague G, Velasquez L. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significacion clinica y perspectivas actuales. Rev Esp Quimioter. 2011.; 24(2): p. 57-66.
55. Castaño L, Bilbao JR. Introducción a la biología molecular y aplicacion a la pediatria: Estudio de mutaciones en ADN amplificado por PCR. An Esp Pediatr. 1997; 46(3): p. 305-310.
56. National Human Genome Research Institute. NIH. [Online]. [cited 2019]. Available from: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Alelo>.
57. NEW ENGLAND Biolab inc. BtsCI NEB. [Online]. [cited 2019 Setiembre]. Available from: [https://international.neb.com/products/r0647-btsci#Product%20Information Product%20Notes](https://international.neb.com/products/r0647-btsci#Product%20Information%20Product%20Notes).
58. Al-Mayahie S, Al Kuriashy J. Distribution of ESBLs among *Escherichia coli* isolates from outpatients with recurrent UTIs and their antimicrobial resistance. J Infect Dev Ctries. 2016; 10(6): p. 575-583.
59. Eshwarappa M, Dosegowda R, Vrithmani I, Khan MW, Shiva Kumar P, Kempegowda P. Clinico-microbiological profile of urinary tract infection in south India. Indian Journal of Nephrology. 2011; 21(1): p. 30-36.
60. Blanco V, Maya J, Correa A, Perenguez M, Muñoz J, Motoa G, et al. Prevalence and risk factors for extended-spectrum-b lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-onset urinary tract infections in Colombia. Enferm Infecc Microbiol. 2016; 34(9): p. 559-565.

61. Al-Mijalli S. Bacterial Uropathogens in Urinary Tract Infection and Antibiotic Susceptibility Pattern in Riyadh Hospital, Saudi Arabia. *Cell Mol Med.* 2017; 3(1:5).
62. Martinez Martinez L. Asociación de BLEE con otros mecanismos de resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007; 25(2): p. 38-47.
63. Kim Yt, Jang JH, Kim HC, Kim H, Lee K, Park KS, et al. Identification of strain harboring both *aac(6')-Ib* and *aac(6')-Ib-cr* variant simultaneously in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *BMB reports.* 2011.
64. WHONET. PROTOCOLO DE TRABAJO RED WHONET ARGENTINA. Buenos Aires: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas.; 2017.
65. Navarro F, Calvo J, Canton R, Fernandez Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29(7): p. 524-534.
66. Performance standards of Antmicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement. Clinical Laboratory Standard International; 2010. Report No.: M100-S23.

ANEXOS

Anexo 1

Ficha de Recolección

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS				FICHA N°	
1. Realizar la confirmación de BLEE.					
¿Es productor de BLEE?				SÍ	NO
	S	I	R	Valor obtenido	Interp.
2. Valor del MIC(μg/mL) por microdilución-CAMH					
	S	I	R		
Norfloxacin 10 μ g	≤ 4	8	≥ 16		
3. Realizar un antibiograma (DD) con el panel de antibióticos.					
Quinolonas	S	I	R		
Ácido nalidíxico 30 μ g	≥ 19 mm	14-18 mm	≤ 13 mm		
Cinoxacin 100 μ g	≥ 19 mm	15-18 mm	≤ 14 mm		
Ciprofloxacina 5 μ g	≥ 21 mm	16-20 mm	≤ 15 mm		
Norfloxacin 10 μ g	≥ 17 mm	13-16 mm	≤ 12 mm		
Lomefloxacina 10 μ g	≥ 22 mm	19-21 mm	≤ 18 mm		
Fleroxacin 5 μ g	≥ 19 mm	16-18 mm	≤ 15 mm		
Ofloxacina 5 μ g	≥ 16 mm	13-15 mm	≤ 12 mm		
Levofloxacina 5 μ g	≥ 17 mm	14-16 mm	≤ 13 mm		
Gemifloxacina 5 μ g	≥ 20 mm	16-19 mm	≤ 15 mm		
Gatifloxacina 5 μ g	≥ 18 mm	15-17 mm	≤ 14 mm		
Carbapenem					
Ertapenem 10 μ g	≥ 22 mm	19-21 mm	≤ 18 mm		
Cefamicinas					
Cefoxitin 30 μ g	≥ 18 mm	15-17 mm	≤ 14 mm		
Aminoglucósidos (VITEK 2.0)	S	I	R		
Amikacina (μ g/mL)	≤ 16	32	≥ 64		
Tobramicina (μ g/mL)	≤ 4	8	≥ 16		
Gentamicina (μ g/mL)	≤ 4	8	≥ 16		
4. Presencia de enzima aac(6')-Ib-cr mediante el screening.				SÍ	NO
5. Presencia del gen aac(6')-Ib-cr mediante el PCR-RFLP.				SÍ	NO
<i>Los diámetros y concentraciones de referencia se obtuvieron del Manual del CLSI 2018 (66)</i>					

Anexo 2

Plantilla para la lectura de la prueba fenotípica

I. Hallazgo del MIC:

MIC (NOR)= [S: ≤ 4 / I = 8 / R: > 16] $\mu\text{g/ml}$

		C(+) C(-) M4 M5 M6											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CALDO MH	M1 A	64	32	16	8	4	2	1	(+)	(-)	32	32	32
	M2 B	64	32	16	8	4	2	1	(+)	(-)	16	16	16
	M3 C	64	32	16	8	4	2	1	(+)	(-)	8	8	8
	M4 D	64	32	16	8	4	2	1	(+)	(-)	4	4	4
	M5 E	64	32	16	8	4	2	1	(+)	(-)	32	16	8
	M6 F	64	32	16	8	4	2	1	(+)	(-)	4		
	M7 G	64	32	16	8	4	2	1	(+)	(-)		8	8
CA-LB	H	32	16	8	4	32	16	8	4	32	16	8	4
		M1	M2				M3						

II. Prueba fenotípica para la enzima aac(6')-Ib-cr

Δ Diámetros ≥ 10 mm ; **POSITIVO** / Δ Diámetros < 10 mm ; **NEGATIVO** .

		MIC		Diámetros (mm)			
CÓDIGO	Nº	MH	LB	Control	Obtenido	Δ (mm)	Result .
	M1						
	M2						
	M3						
	M4						
	M5						
	M6						
	M7						

Anexo 3

Método de Inactivación del Norfloxacin

MATERIALES:

- ❖ Pocillos de *E. coli* en L-B con crecimiento de norfloxacin a 8 µg/mL (100µL).
- ❖ Pocillos con caldo L-B de norfloxacin a 8 µg/mL, sin bacterias (100µL).
- ❖ Tubos graduado con escala 0,5 McFarland.
- ❖ Tubos con caldo TSB.
- ❖ Placas con medio Mueller-Hinton.
- ❖ Discos en blanco sin antibiótico.
- ❖ Cepa de *E.coli* ATCC 25922.
- ❖ Hisopos estériles.
- ❖ Mechero de bunsen.
- ❖ Asas en punta.
- ❖ Pinzas.
- ❖ Regla.
- ❖ Incubadora a 35C°.
- ❖ Pipeta de 10 µL y tips.

PROCEDIMIENTO

- Se seleccionaron aquellas *E. coli* que tengan un MIC (con caldo CAMH) \geq 8µg/mL.
- Se procedió a realizar otro MIC (con caldo L-B), pero reemplazando el M-H por el L-B.
- Se dispuso un pocillo con caldo de concentración de norfloxacin 8 µg /mL sin presencia de bacteria como control.
- Se realizó una siembra en tapete de una *E.coli* ATCC 25922 en una placa de Mueller-Hinton y se colocaron discos en blanco sin antibiótico.

- Se seleccionaron los pocillos de norfloxacin de 8 µg/mL (100 µL) con inóculo bacteriano que tengan crecimiento del MIC con L-B.
- Se alicuotaron 10 µL de cada cepa de *E. coli* con crecimiento en norfloxacin a 8 µg /mL a cada disco en blanco y se dejó en incubación a 37 °C durante 15-18 horas.

Protocolo de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por cada aislado en caldo L-B y M-H												
Agregar los diluyentes a los pocillos y mezclar con la solución stock de antibiótico.												
N° Pocillos	Vol. inicial	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Control (+)	Control (-)
Sol. stock antibiótico 128 µg/ml	-	50 µL			-	-	-	-		-	-	-
Caldo de L-B o M-H	-	-	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	100 µL
Realizar diluciones sucesivas 1:2 a partir de la solución stock (50 µL) y llevando a un volumen final de 50 µL.												
Volumen final	-	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	100 µL
Concentración final de antibiótico	-	128 µg/ mL	64 µg/ mL	32 µg/ mL	16 µg/ mL	8 µg/ mL	4 µg/ mL	2 µg/ mL	1 µg/ mL	0.5 µg/ mL	-	-
Agregar el inóculo ajustado previamente												
Inóculo ajustado 1 x 10 ⁶ UFC/ml	-	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	-
Mezclar e incubar a 35C° por 16 a 20 h y determinar el MIC												
Volumen final	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Concentración final de antibiótico	-	64 µg/ mL	32 µg/ mL	16 µg/ mL	8 µg/ mL	4 µg/ mL	2 µg/ mL	1 µg/ mL	0.5 µg/ mL	0.25 µg/ mL	-	-
Inóculo final	5 x 10 ⁵ UFC/ml											-

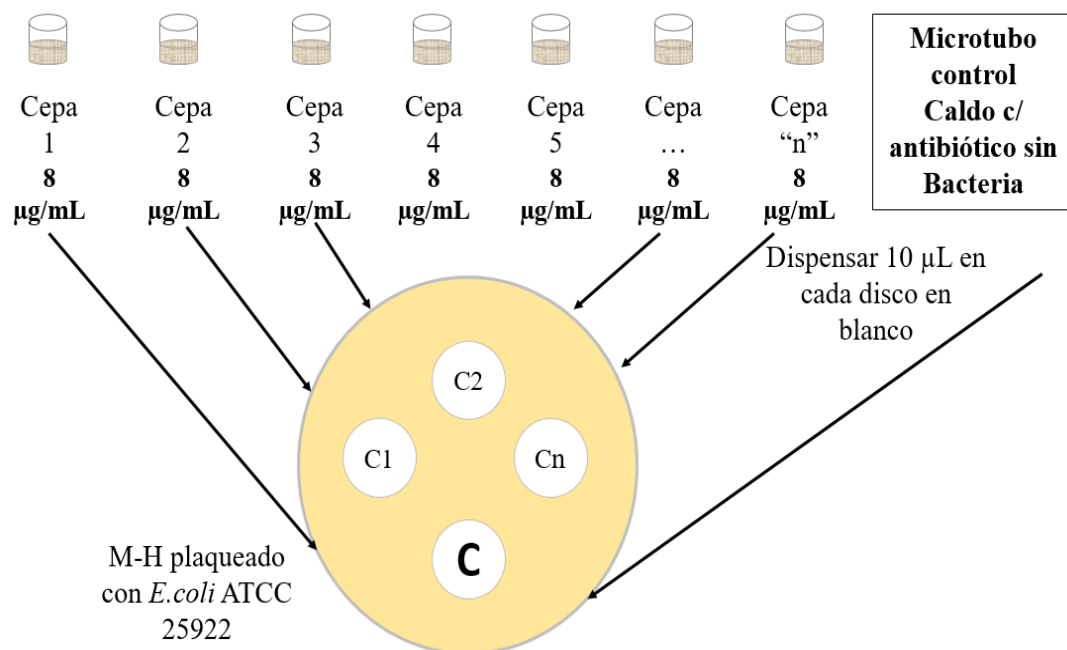


Figura 6. Esquema para la selección del pocillo de 8 µg/mL para la prueba fenotípica.

RESULTADOS

- El disco control debe mostrar un aproximado de 18 mm de zona de crecimiento inhibido (correspondiendo a 80 ng ó 0,08 µg de norfloxacin por disco).
- Una diferencia en los diámetros de inhibición $\Delta \geq 10$ mm con respecto al diámetro de inhibición del control es considerado como test (+) para la producción de aac(6')-Ib-cr; mientras que aquellos diámetros de inhibición que tengan un $\Delta < 10$ mm con respecto al control, se considera test(-) para la producción de aac(6')-Ib-cr.

INTERPRETACIÓN

- Los discos en blanco, al ser alicuotados con 10 μ L de cada solución de cepa con antibiótico, están siendo cargados de antibiótico, por lo tanto, producirán un diámetro de inhibición.
- El disco control, al tener antibiótico, (no posee inóculo bacteriano) producirá un diámetro de inhibición aproximado de 18 mm.
- Los discos con un $\Delta \geq 10$ mm de diámetro de inhibición con respecto al control, es debido a la inactivación por acetilación del antibiótico por parte de las cepas poseedores de la enzima aac(6')-Ib-cr, lo que produce una baja concentración de antibiótico activo en el disco y se demuestra con el fácil crecimiento de la *E. coli* ATCC 25922 alrededor del disco (Antibiótico inactivo).
- Los discos con un $\Delta < 10$ mm de diámetro de inhibición con respecto al control, es debido a que el antibiótico quinolónico no ha sido inactivado por la enzima aac(6')-Ib-cr, porque las cepas evaluadas poseen mecanismos de resistencia diferentes a la acetilasa (bombas de eflujo, antibiótico libre post acción bactericida, etc.) y esto se demuestra por el diámetro de inhibición moderado-fuerte que produce este disco alrededor de la *E. coli* ATCC 25922 (Antibiótico activo).

Anexo 4

Screening para detección de enzima aac(6')-Ib-cr mediante la Δ (LEV-CIP) de halos ⁽⁵²⁾

CÓDIGO	BLEE	AN mm	CIP mm	LEV mm	Gen <i>aac-(6')-Ib</i>	Gen <i>aac-(6')-Ib-cr</i>	Antibiograma Δ LEV-CIP
1	POS	6	27	25	NEGATIVO	0	-2
2	POS	6	12	14	NEGATIVO	0	2
3	POS	6	6	8	POSITIVO	POSITIVO	2
4	POS	6	6	10	POSITIVO	POSITIVO	4
5	POS	6	6	8	POSITIVO	POSITIVO	2
6	POS	6	6	9	NEGATIVO	0	3
7	POS	11	19	19	NEGATIVO	0	0
8	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
9	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
10	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
11	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
12	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
13	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
14	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
15	POS	21	27	26	NEGATIVO	0	-1
16	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
17	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
18	POS	6	22	20	NEGATIVO	0	-2
19	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
20	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
21	POS	6	6	9	POSITIVO	POSITIVO	3
22	POS	6	6	10	NEGATIVO	0	4
23	POS	14	22	21	NEGATIVO	0	-1
24	POS	6	30	30	NEGATIVO	0	0
25	POS	6	6	8	POSITIVO	POSITIVO	2
26	POS	6	6	8	NEGATIVO	0	2
27	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
28	POS	6	8	13	NEGATIVO	0	5
29	POS	24	30	30	NEGATIVO	0	0
30	POS	6	6	8	POSITIVO	POSITIVO	2
31	POS	6	6	8	NEGATIVO	0	2
32	POS	6	6	10	NEGATIVO	0	4
33	POS	14	20	20	NEGATIVO	0	0
34	POS	6	10	9	NEGATIVO	0	-1
35	POS	6	9	9	NEGATIVO	0	0

36	POS	6	6	10	POSITIVO	POSITIVO	4
37	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
38	POS	6	6	9	POSITIVO	POSITIVO	3
39	POS	6	6	10	POSITIVO	POSITIVO	4
40	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
41	POS	6	6	8	NEGATIVO	0	2
42	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
43	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
44	POS	6	6	9	POSITIVO	POSITIVO	3
45	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
46	POS	6	27	26	NEGATIVO	0	-1
47	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
48	POS	6	6	8	POSITIVO	POSITIVO	2
49	POS	6	9	8	NEGATIVO	0	-1
50	POS	6	6	8	POSITIVO	POSITIVO	2
51	POS	6	6	8	POSITIVO	POSITIVO	2
52	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
53	POS	6	6	10	POSITIVO	POSITIVO	4
54	POS	8	20	21	NEGATIVO	0	1
55	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
56	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
57	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
58	POS	6	6	9	POSITIVO	POSITIVO	3
59	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
60	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
61	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
62	POS	6	6	8	POSITIVO	POSITIVO	2
63	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
64	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
65	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
66	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
67	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
68	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
69	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
70	POS	6	6	8	POSITIVO	POSITIVO	2
71	POS	6	10	11	NEGATIVO	0	1
72	POS	6	7	9	NEGATIVO	0	2
73	POS	6	6	10	POSITIVO	POSITIVO	4
74	POS	6	6	8	POSITIVO	POSITIVO	2
75	POS	6	6	7	POSITIVO	POSITIVO	1
76	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0

77	POS	6	6	8	NEGATIVO	0	2
78	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
79	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
80	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
81	POS	6	6	8	NEGATIVO	0	2
82	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
83	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
84	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
85	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
86	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
87	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0
88	POS	6	22	21	NEGATIVO	0	-1
89	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
90	POS	6	6	6	POSITIVO	POSITIVO	0
91	POS	6	6	6	NEGATIVO	0	0

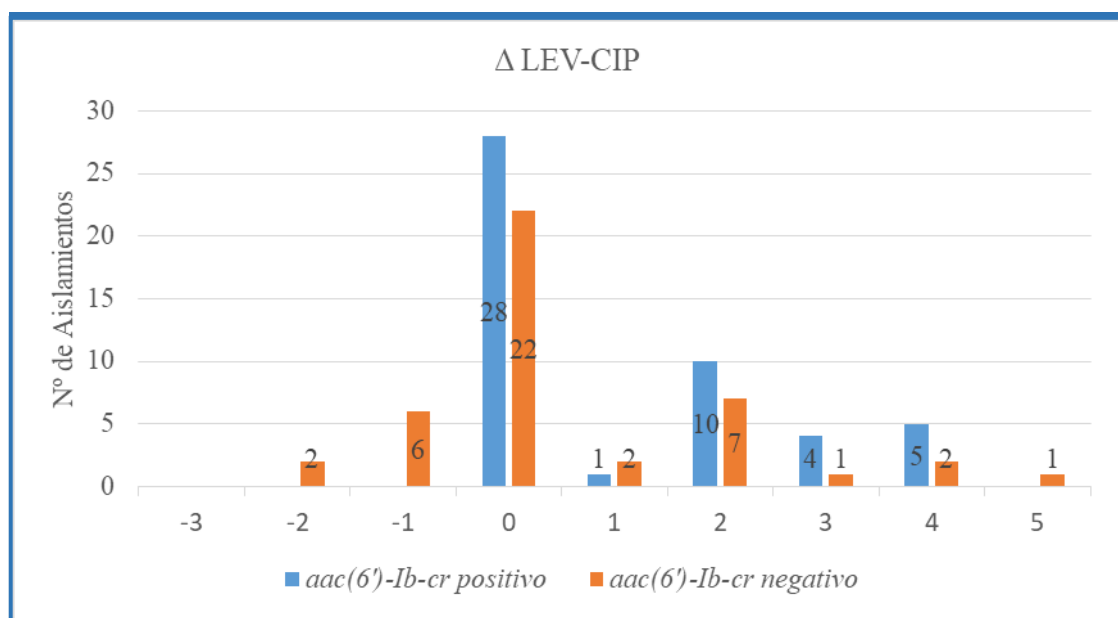


Gráfico 3. Diferencia de halos entre CIP y LEV.

Anexo 5. Operacionalización de variables.

VARIABLES	DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSIONES	SUB- DIMENSION	INDICADOR	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION	CODIFICACIÓN	FUENTE DE VERIFICACION
Presencia del gen <i>aac(6')-Ib-cr</i>	Una secuencia de nucleótidos que codifican un enzima capaz de inhibir a las fluoroquinolonas	Secuencia de nucleótidos presentes en el plásmido o transposón	Secuencia de nucleótidos	PCR	Cualitativa	Nominal	Presencia del gen <i>aac(6')-Ib-cr</i> Ausencia de gen <i>aac(6')-Ib-cr</i>	Ficha de recolección de datos.
Susceptibilidad antibiótica a ciprofloxacina	Capacidad de respuesta de la bacteria a diferentes concentraciones de ciprofloxacina	Resistencia o sensibilidad antibiótica a ciprofloxacina	Resistencia a ciprofloxacina	Disco difusión	Cualitativa	Nominal	Diámetro ≤ 15 (Resistente) Diámetro 16 - 20 (Intermedio) Diámetro ≥ 21 (Sensible)	Ficha de recolección de datos.
				Concentración mínima inhibitoria	Cualitativa	Nominal	MIC ≥ 4 ug/ml (Resistente) MIC < 1 ug/ml (Sensible)	Ficha de recolección de datos.
Susceptibilidad antibiótica a norfloxacina	Capacidad de respuesta de la bacteria a diferentes concentraciones de norfloxacina	Resistencia o sensibilidad antibiótica a norfloxacina..	Resistencia a norfloxacina.	Disco difusión	Cualitativa	Nominal	Diámetro ≤ 12 (Resistente) Diámetro 13 - 16 (Intermedio) Diámetro ≥ 17 (Sensible)	Ficha de recolección de datos.
				Concentración mínima inhibitoria	Cualitativa	Nominal	MIC ≥ 16 ug/ml (Resistente) MIC < 4 ug/ml (Sensible)	Ficha de recolección de datos.

Anexo 6

Clasificación de las enzimas betalactamasas según Bush-Jacoby

Grupo Bush-Jacoby 2009	Clase molecular	Substratos preferidos	Inhibidos por		Enzimas representativas
	Subclase		AC	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	No	No	AmpC, P99, ACT1, CYM-2, FOX-1, MIR-1.
1e	C	Cefalosporinas	No	No	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilina	Si	No	PC1
2b	A	Penicilinas y Cefalosporinas	Si	No	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be*	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactamicos	Si	No	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	No	No	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactamicos	No	No	TEM-50
2c	A	Carbenicilinas	Si	No	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilinas, Cefepime.	Si	No	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variable	No	OXA-1, OXA-10.
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	No	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenémicos	Variable	No	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Si	No	CepA
2f	A	Carbapenémicos	Variable	No	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B(B1)	Carbapenémicos	No	Si	IMP-1, VIM-1, CrA, IND-1
	B(B3)	Carbapenémicos			L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B(B2)	Carbapenémicos	No	Si	CphA, Sfh-1

Fuente: Mosquito S. et al 2011. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública Vol. 28(4). * Betalactamasas de espectro extendido.

Anexo 8

Lista de figuras	Pág.
Figura 1. Estructura química de la kanamicina y su anillo aminociclitol.	15
Figura 2. Estructura química de la ciprofloxacina..	17
Figura 3. Estructura química del anillo β -lactámico	21
Figura 4. Sitios de modificación química de las EMA sobre la kanamicina A.	27
Figura 5. Reacciones y lugar de modificación de las EMAs.	28
Figura 6. Esquema para la selección del pocillo de 8 μ g/mL para la prueba fenotípica.	96

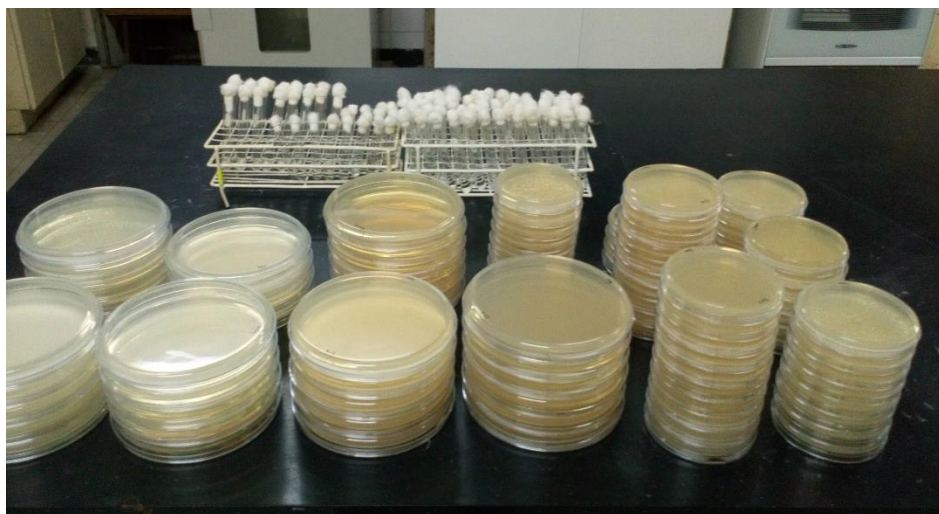
Anexo 9

Lista de fotografías

Pág.

Fotografía 1. Desarrollo de <i>E. coli</i> BLEE en agar TSA y CHROMagar.	56
Fotografía 2. Confirmación de BLEE de la <i>E. coli</i> código 31 por el mét. de Jarlier.	57
Fotografía 3. Antibiograma de quinolonas y no quinolonas para el aislado 50.	59
Fotografía 4. Antibiograma de quinolonas y no quinolonas para el aislado 35.	60
Fotografía 5. Hallazgo del MIC para norfloxacin con los caldos M-H y L-B realizado en el IMT DAC-UNMSM.	62
Fotografía 6. Prueba fenotípica para la detección de la enzima <i>aac</i> -(6')-Ib-cr..	63
Fotografía 7. Amplificación del alelo <i>aac</i> (6')-Ib-cr en las <i>E. coli</i> BLEE.....	68
Fotografía 8. PCR-RFLP mediante digestión con la enzima BtsCI de los amplicones de <i>aac</i> (6')-Ib..	69
Fotografía 9. Límite de detección para la amplificación del gen <i>aac</i> (6')-Ib.	70
Fotografía 10. Agar Mueller-Hinton controlado para la prueba de sensibilidad antibiótica.	105
Fotografía 11. Discos de quinolonas según las diferentes generaciones.....	105
Fotografía 12. Procedimiento de la detección de enzima acetilasa.	106
Fotografía 13. Lisis bacteriana por ebullición en termoblock.	106
Fotografía 14. Amplificación en termociclador Biorad.	107
Fotografía 15. Electroforesis en gel de agarosa para la visualización de bandas... ..	107

Anexo 10



Fotografía 10. Agar Mueller-Hinton controlado para la prueba de sensibilidad antibiótica.



Fotografía 11. Discos de quinolonas según las diferentes generaciones.



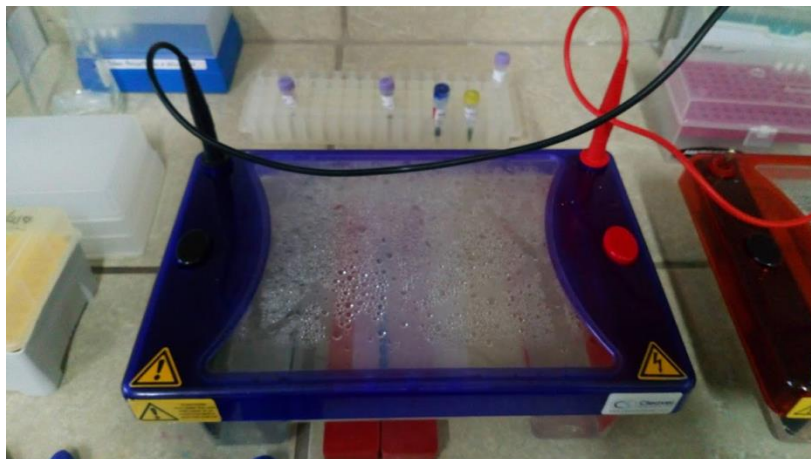
Fotografía 12. Procedimiento de la detección de enzima acetilasa, colocación de los discos en blanco.



Fotografía 13. Lisis bacteriana por ebullición en termoblock.



Fotografía 14. Amplificación en termociclador Biorad.



Fotografía 15. Electroforesis en gel de agarosa para la visualización de bandas.

Anexo 11

Autorización de Investigación

	PERU	Ministerio de Salud	Hospital Nacional Docente Madre Niño "San Bartolomé"	Oficina de Apoyo a la Docencia e Investigación
---	------	---------------------	--	--

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

Lima, 18 de setiembre de 2018

OFICIO N° 0620-2018-OADI-HONADOMANI-SB

LUIS E. VELÁSQUEZ REYES
Investigador Principal
Presente. –

Exp. N° 011081-18-18

Tengo el agrado de dirigirme a usted para saludarlo cordialmente y en relación al Proyecto de Investigación titulado:

"FRECUENCIA DEL GEN *aac(6')*-*lb-cr* EN *Escherichia coli* UROPATÓGENAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN EL HOSPITAL NACIONAL DOCENTE MADRE NIÑO SAN BARTOLOMÉ, LIMA-2018".

Al respecto se observa lo siguiente:

El planteamiento del estudio y la metodología, incluyendo el análisis estadístico propuesto para la evaluación de los resultados son apropiados para el proyecto.

Conclusión

El proyecto con Expediente N°0110801-18. Esta aprobado por el Comité de Ética Institucional e Investigación de manera expedita.

Nos es propicia la oportunidad para renovar los sentimientos de nuestra consideración y estima personal.

Atentamente,



MINISTERIO DE SALUD
HOSPITAL NACIONAL DOCENTE MADRE NIÑO
SAN BARTOLOMÉ

M.C. HUGO VELAZCO BARRERA
Oficina de Apoyo a la Docencia e Investigación

EVL/vma
cc:archivo

Av. Alfonso Ugarte 825 4to piso Lima – Perú

Teléfono 2010400- anexo 162



PERÚ Ministerio de Salud

SERVICIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA



NOTA INFORMATIVA N°0501 - SPC - HONADOMANI-SB-2019

A : LUIS E. VELASQUEZ REYES
Bachiller de Tecnología Médica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

De : Dra. GISSELLE DIAZ INCA
Jefa del Servicio de Patología Clínica

Asunto : APROBACION DE EJECUCION DE PROYECTO DE INVESTIGACION

Fecha : Lima, 04 de Noviembre del 2019

Antes que nada, reciba mi más cordial saludo, la presente tiene por objeto INFORMARLE en relación a su solicitud de aprobación de ejecución de proyecto de investigación.

Al respecto, esta Jefatura **NO tiene ningún inconveniente en permitirle** desarrollar su proyecto de investigación: "Frecuencia del Gen aac(6)-Ib-cr en *Escherichia coli* Uropatógenas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en el Hospital Nacional San Bartolomé, Lima 2018", en el área de Microbiología del Servicio de Patología Clínica.

Sin otro particular me despido de usted.

Atentamente

GDI
Cc archivo

MINISTERIO DE SALUD
HONADOMANI SAN BARTOLOME
.....
GISSELLE H. DIAZ INCA
Médica Patólogo Clínico
CMP: 30133 RNE: 19414
Jefe(a) del Servicio de Patología Clínica